Série A, n° 2473
N° d'ordre :
3345

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Louis SALOMON

1re THÈSE. — RECHERCHES BIOLOGIQUES SUR LA CULTURE DU VIRUS DE LA FIÈVRE APHTEUSE

2e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 19 JUIN 1952 devant la Commission d'examen.

MM. GRASSÉ *Président.*

THOMAS
MACHEBŒUF } *Examinateurs.*

1952

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552216_0001

SÉRIE A, N° 2473
N° D'ORDRE :
3345

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Louis SALOMON

1re **THÈSE.** — RECHERCHES BIOLOGIQUES SUR LA CULTURE DU VIRUS DE LA FIÈVRE APHTEUSE

2e **THÈSE.** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 19 JUIN 1952 devant la Commission d'examen.

MM. GRASSÉ — *Président.*

THOMAS
MACHEBŒUF — *Examinateurs.*

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen .... M. A. CHATELET.

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
A. DENJOY	T	Théorie des Fonctions.
L. LUTAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique.
E. DARMOIS ...	T	Enseignement de Physique.
Robert LÉVY ..	T	Physiologie comparée.
Mme RAMART-LUCAS	T	Chimie organique.
FOCH	T	Mécanique physique et expérimentale.
PAUTHENIER ...	T	Electrotechnique générale.
De BROGLIE ...	T	Théories physiques.
JOB	T	Chimie générale.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.
COMBES	T	Physiologie végétale.
GARNIER	T	Géométrie supérieure.
PÉRÈS	T	Mécanique des fluides et applications.
LAUGIER	T	Physiologie générale.
TOUSSAINT	T	Technique Aéronautique.
M. CURIE	T	Physique (P.C.B.).
G. RIBAUD	T	Hautes températures.
CHAZY	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.
CROZE	T	Physique théorique et physique céleste
DUPONT	T	Théories chimiques.
VALIRON	T	Calcul différentiel et Calcul intégral.
BARRABÉ	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.
VAVON	T	Analyse et mesures chimiques.
G. DARMOIS ...	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.
Jacques BOURCART ...	T	Géographie physique et Géologie dynamique.
AUBEL	T	Chimie biologique.
Mme JOLIOT-CURIE	T	Physique générale et Radioactivité.
PLANTEFOL	T	Botanique.
CABANNES	T	Recherches physiques.
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés.
PRÉVOST	T	Chimie organique.
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la Géométrie.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.
WYART	T	Minéralogie.
TEISSIER	T	Zoologie.
MANGENOT	T	Biologie végétale.
P. AUGER	T	Physique quantique et relativité.
MONNIER		Physiologie générale.
PIVETEAU	T	Géologie.
ROCARD	T	Physique.
H. CARTAN	T	Mathématiques (E.N. Supérieure).
SCHAEFFER	T	Physiologie des Fonctions.
LAFFITTE	T	Chimie générale.
FAVARD	T	Mécanique générale.
COULOMB	T	Physique du Globe.
Mlle COUSIN ..	T	Biologie animale (P.C.B.).
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.
P. DRACH	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique.
CHATELET	T	Arithmétique et théorie des nombres.
EPHRUSSI	T	Génétique.
WURMSER	T	Biologie physico-chimique.
BAUER	T	Chimie - Physique.
RIVIERE		Géologie (P.C.B.).
GAUTHERET	T	Biologie végétale (P.C.B.).
LUCAS	T	Physique.
A. THOMAS	T	Evolution des êtres organisés.
ARNULF		Optique appliquée.
Max MORAND ..		Physique.
SOLEILLET		Physique.
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.
DANJON	T	Astronomie.
FROMAGEOT	T	Chimie biologique.
LAPORTE	T	Physique générale et Radioactivité.
JANET	T	Mathématiques générales.
PETIT	T	Biologie maritime.
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T	Biologie animale (P.C.B.).
EICHHORN		Biologie végétale (P.C.B.).
De CUGNAC		Biologie végétale (P.C.B.).
Mlle CAUCHOIS .	T	Chimie-Physique.
THELLIER		Physique du Globe.
AUDUBERT		Electrochimie.
L'HÉRITIER		Génétique.
GRIVET	T	Radio Electricité.
PONCIN		Mécanique des fluides.
THIRY	T	Mécanique appliquée.
DUBREIL		Mathématiques générales.
QUELET		Chimie (P.C.B.).
CAGNIARD		Géophysique appliquée.
CHAMPETIER ...		Chimie appliquée.
CUVILLIER		Géologie structurale et Géologie appliquée.
JUNG	T	Pétrographie.
TRILLAT		Physique (P.C.B.).
WIEMANN		Chimie (P.C.B.).
LICHNEROWICZ .		Mathématiques générales.
JACQUINOT	T	Physique (P.C.B.).
VASSY		Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES ...		Théories physiques.
M. PRUVOST ...	T	Géologie.
AMIEL		Chimie (P.C.B.).
HOCART		Minéralogie.
MACHEBŒUF ...		Microbiologie.
J.-P. MATHIEU .		Physique (P.C.B.).
COUTEAUX		Biologie animale (P.C.B.).
MAY		Biologie animale (P.C.B.).
CHOQUET		Calcul différentiel.
FELDMANN		Biologie (P.C.B.).
GUINIER		Physique (P.C.B.).
JOST		Biologie (P.C.B.).

R. UNIV BIBLIOTHEEK LEIDEN

Secrétaire .... Ch. MONIER.

RECHERCHES BIOLOGIQUES SUR LA CULTURE

DU VIRUS DE LA FIEVRE APHTEUSE

PARIS 1952

A Monsieur le Professeur Pierre P. GRASSE

Membre de l'Institut

qui nous a fait le grand honneur de bien vouloir accepter la présidence du Jury de notre thèse.

Témoignage de notre vive reconnaissance pour l'accueil qu'il nous a réservé dans son Laboratoire.

A Monsieur le Professeur J.-André THOMAS

qui nous a inspiré le sujet de cette thèse et nous a prodigué ses précieux conseils et ses encouragements au cours de notre séjour dans son Laboratoire.

Qu'il trouve ici l'expression de notre respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur Michel MACHEBOEUF

qui a bien voulu faire partie du Jury de notre thèse.

En témoignage de notre gratitude.

A ma femme,

A ma fille,

A mes parents,

En gage de ma profonde affection
et de mon infinie reconnaissance.

[illegible]

"[illegible] solution au [illegible] recherche [illegible] n'attende rien au hasard [illegible] organisation scientifique [illegible] recherche opiniâtre, à un effort [illegible] ce la verrue. [illegible] sont nombreux à franchir et qu'il [illegible] surmontés [illegible] ont [illegible]."

[illegible]

[illegible] théorique [illegible] grande partie, à la difficulté de leur cul[illegible] posées par la réalisation de telles cultur[illegible] aident à la solution des nombreuses énigmes relatives aux [illegible] filtrants. Les cultures de virus facilitent pratiquement la [illegible]

[illegible] fièvre aphteuse est l'un des plus intéressants [illegible] paration, de son inoculation suivie d'une évolution rapide [illegible]

[illegible]

francs de pertes. Les dommages sont de divers ordres : mortalité (jusqu'à 30 p. 100 dans certaines épizooties), morbidité et complications : avortements, diminution de la production du lait, de la viande, de la graisse et du [illegible].

Il est difficile de chiffrer les pertes. NOCARD & LECLAINCHE estiment que l'épizootie de 1893 a coûté plus d'un milliard et demi à l'Europe. Ces chiffres sont basés sur la dépréciation moyenne, évaluée, par tête, à : 52 F,50 en Angleterre, 45 marks (56 F,25) en Allemagne, 50 F en France, si la fièvre aphteuse évolue sous forme bénigne et [illegible] si elle est maligne. [illegible], en Suisse (1921), évalue le dommage total à 50 p. 100 de la valeur monétaire des effectifs atteints. La dernière épizootie des États-Unis, en Californie (1919-1925), a entraîné l'abatage de 58.791 bovins, 21.195 porcins, 28.552 moutons, 1.591 chèvres et 22.214 daims. Celle de 1937, en Europe, a sévi avec intensité pendant 3 ans mais n'était pas complètement éteinte 10 ans après. On a pu estimer ses dégâts, en France, à plus de 7 milliards de francs. De 1937 à 1940 l'épizootie a coûté, à l'Allemagne, 1 milliard et demi de marks, alors que la production totale du fer en Allemagne était de 770 millions de marks, dans les années antérieures à la guerre. En 1942, l'Angleterre a payé 1.163.310 livres à titre d'indemnités pour abatages obligatoires.

En Décembre 1946, après une importation de zébus provenant du Brésil, la fièvre aphteuse débute au Mexique. L'abatage exigé, à la suite d'accords internationaux, par les États-Unis pour la protection de leur territoire [illegible] (1), provoque le sacrifice, au Mexique, de près d'un million d'animaux, une dépense de 120 millions de dollars soit 42 milliards de francs, la mobilisation de 20.000 hommes de troupe, des troubles [illegible] population, l'interdiction de l'exportation des viandes du Mexique, l'augmentation du prix de la viande aux États-Unis.

Cette sévère méthode de "stamping out" échoua en raison de certains facteurs locaux : nature du pays, répartition et nombre des [illegible], difficultés de transport, [illegible] ; il est nécessaire de recourir, finalement, à la vaccination. En 1949 et 1950, 53 millions de doses de vaccin furent fabriquées. L'ampleur

(1) La valeur du cheptel, aux U.S.A., est évaluée à 1[illegible] milliards de dollars, soit environ 2 fois la valeur totale de l'industrie de l'acier (1946).

[illegible] doit entraîner une [illegible] préparation compliquée, de [illegible] une immunité de courte durée, [illegible] de doses.

[illegible] prix de revient d'un bon vaccin est très élevé ; il [illegible] dire combien la culture abondante et économique du virus [illegible] de porcinal, mais pour le monde entier.

[illegible] fièvre aphteuse a fait l'objet de multiples études, [illegible] grès nationaux et internationaux, l'Office International [illegible] a même créé une Commission spéciale d'Étude.

[illegible] Laboratoire [illegible] fondé [illegible] y ont [illegible] sont considérables et ont contribué à lever bien des inconnues [illegible] connaissance du virus aphteux et, ce faisant, ont augmenté le [illegible] tige de la Science française [illegible]

[illegible] (vaccin qui a fait ses preuves dans le monde entier) et celle du [illegible]

[illegible] obtenu par la [illegible]

[illegible]

[illegible] ont déterminé le Ministère [illegible] sur l'initiative de Messieurs les [illegible] Vétérinaires, Monsieur le Directeur [illegible] le Directeur MERLE, Membres de l'Office [illegible] des Epizooties, à charger nos Maîtres, [illegible] le Directeur FAIBRY et Monsieur le Professeur J.-[illegible] de la mission d'étudier, avec Madame SALOMON et nous-même, la culture en masse du virus aphteux.

Sous la direction de nos deux Maîtres nous [illegible] personnellement cultivé le virus aphteux sur un [illegible] naturellement ultrafiltré : le liquide [illegible]. En collaboration avec eux, et sous leurs directives, nous avons contribué à mettre au point deux autres techniques nouvelles de culture en masse du virus aphteux (1) :

<u>in vitro</u> : sur liquide amniotique (méthode de [illegible], [illegible] SALOMON et J.-Paul [illegible]).

<u>in vitro</u> : sur peau de foetus bovins ma[illegible] mentalement en survie par pe[illegible] (méthode de J.-André THOMAS [illegible] FAIBRY, Louis et Léone SALOMON).

En 1947, Monsieur le D[illegible], poursuivant ses recherches [illegible], a mis au point une nouvelle méthode de culture en masse <u>in vitro</u> du virus aphteux sur épithélium de langue, en milieu original. Cette importante découverte fera l'objet d'une étude spéciale au cours de notre travail.

Ces méthodes permettent d'obtenir des quantités appréciables de virus de qualit[illegible]. Le virus cultivé sur des tissus d'origine bovine : principe fondamental sans lequel ses qualités virulentes et an[illegible] pour cette espèce à laquelle le vaccin est généralement destiné. Le virus de culture est suffisamment virulent, stable, antigénique. Nous espérons que ces nouvelles mé[illegible] plus petits virus et l'un des plus difficiles à cultiver.

---

(1) [illegible] méthode a été mise au point par la [illegible] embryome spécifique chez [illegible]. Elle est actuellement en cours de publication.

entraîneront la culture d'autres virus, contribueront à une meilleure connaissance des virus et aideront à la lutte contre les viroses animales et humaines.

Les expériences ont été réalisées au Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort et au Laboratoire de Biologie Cellulaire de la Sorbonne et de l'École des Hautes Études (à l'Institut du Radium).

Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus respectueux à Monsieur le Docteur J.-Pierre THIERY, Directeur du Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort, pour les conseils, l'aide et les encouragements qu'il n'a cessé de nous témoigner pour cette étude. Qu'il sache combien nous lui sommes reconnaissant de nous avoir fait profiter de sa grande connaissance de la fièvre aphteuse et de nous avoir communiqué les archives et documents du Laboratoire.

Monsieur le Professeur J.-André THOMAS a bien voulu, pendant plus de cinq années, nous accueillir et nous faire l'honneur de travailler à son Laboratoire, ainsi nous avons pu profiter, mieux que quiconque, de son précieux enseignement. Il nous a initié à ses méthodes originales de culture de tissus, de survie d'organes et à la manipulation de ses appareils de survie. Nous avons conscience de tout ce que nous avons appris chez lui, de son hospitalité merveilleuse et nous le prions de trouver ici l'expression de nos plus vifs sentiments de reconnaissance.

Monsieur le Professeur J.-André THOMAS a bien voulu nous donner le sujet de cette thèse, il en a précisé le plan, discuté les expériences et suivi le travail, au fur et à mesure de sa réalisation. Nous l'en remercions bien vivement.

Nous ne saurions oublier Mademoiselle [illegible], Secrétaire de la Direction, et Madame [illegible], du Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, qui nous ont rendu [illegible] services dans l'impression de ce travail.

I) P L A N

Avant d'entreprendre l'étude détaillée des essais de culture du virus aphteux objet de nos principales recherches, nous avons pensé qu'il serait utile de résumer, brièvement, les propriétés du virus aphteux et, à cette occasion, résumer quelques expériences originales non publiées. Ces recherches personnelles sont préliminaires à nos expériences proprement dites, elles précisent certains points particuliers.

La culture du virus aphteux est scindée en deux parties :

- les divers procédés anciens de culture du virus aphteux (simple revue critique de travaux d'importance inégale),
- les nouveaux procédés de culture correspondants aux travaux récents des écoles de FRENKEL et de J.-André THOMAS.

Ces dernières méthodes sont susceptibles de donner des cultures massives et semblent devoir supplanter, dans un proche avenir, les précédentes techniques.

II) ETUDE DU VIRUS APHTEUX

1) GENERALITES

2) PROPRIETES du VIRUS APHTEUX

A) PROPRIETES PHYSIQUES

B) PROPRIETES CHIMIQUES

C) PROPRIETES BIOLOGIQUES :

a) pouvoir pathogène :

[illegible]

caractères du virus

identification du virus

conservation du virus

b) pouvoir immunisant

3) LUTTE contre le VIRUS APHTEUX

III) CULTURE DU VIRUS APHTEUX

1) Les DIVERS PROCEDES ANCIENS de CULTURE du VIRUS APHTEUX :

A) CULTURE IN VIVO :

a) espèce bovine :

lymphe et paroi des aphtes

salive

sang

b) espèce porcine :

lymphe

aphtes artificiels

c) espèce ovine :

pustules de Borrel

culture en symbiose avec le virus claveleux

oedèmes artificiels

d) espèces de laboratoire :

cobayes

lapins

souris

e) facteurs favorisant les cultures in vivo

B) CULTURE IN OVO

C) CULTURE IN VITRO

a) culture en symbiose avec des levures et des bactéries

b) culture en milieux dépourvus de cellules vivantes :

essais divers

facteurs influençant la survie du virus

c) culture sur les cultures de tissus

procédés expérimentaux :

techniques générales
résultats
applications pratiques

culture du virus aphteux :

méthodes de CARREL et dérivées
méthodes de MAITLAND et dérivées
[illegible]

[illegible] de CULTURE en MASSE du VIRUS [illegible]

[illegible] et fièvre aphteuse

A) CULTURE IN VITRO sur EPITHELIUM de LANGUE ou de [illegible] (méthode de FRENKEL)

B) CULTURE sur FOETUS BOVIN MIS en SURVIE EXPERIMEN- [illegible] PERFUSION (méthode de J. André THOMAS, J.-Pierre THIERY, Louis et Léone SALOMON)

a) matériel utilisé

b) [illegible] expérimental de la survie aseptique [illegible]

c) perfusion aseptique des foetus de Bovin

d) culture du virus aphteux

C) CULTURES IN VITRO en MILIEUX ULTRAFILTRES ou DEPROTEINES :

Introduction : Culture en sérum ultrafiltré

a) culture en liquide amniotique déprotéiné (méthode de J.-André THOMAS, J.-Pierre THIERY, Louis et Léone SALOMON & J.-Paul THIERY)

b) culture en liquide céphalo-rachidien :

matériel

préparation des constituants :

suspension virulente
tissus
liquide céphalo-rachidien

conditions générales et d'incubation

évolution des cultures

résultats

variations des éléments de culture :

tissus
liquide céphalo-rachidien
incubation

variations des conditions de culture

Dosage des filtrats de cultures
conclusions

IV) DISCUSSION GENERALE

V) CONCLUSIONS

VI) BIBLIOGRAPHIE

II) ETUDE DU VIRUS APHTEUX

1) GENERALITES

Le virus aphteux est un élément spécifique, probablement corpusculaire, de dimensions inframicroscopiques, produisant, chez les animaux à onglons, une maladie contagieuse, virulente et ino- [illegible] par un état fébrile initial suivi d'une éruption vésiculeuse sur les muqueuses buccales et la peau des mamelles et des espaces interdigités.

Le virus aphteux appartient [illegible] catégorie des êtres qualifiés "de raison" par ROUX en [illegible]. Il est de la lignée de ces ultragermes de nature exacte [illegible], infiniment plus petits que les bactéries,
-invisibles aux plus puissants grossissements des microscopes optiques,
-filtrant à travers les bougies imperméables à toutes les bactéries,
-incultivables dans les milieux habituels de bactériologie ne contenant pas de cellules vivantes,
-[illegible],
-parasites obligatoires de cellules vivantes,
-[illegible]
y compris les bactéries.

C'est au génie de PASTEUR et de ROUX que l'on doit, non seulement la découverte par le raisonnement de ces agents infectieux, mais la base des études virologiques par leurs recherches sur la rage (1880-1881).

"N'y aurait-il pas de microbe rabique ?" demandait BOULEY à PASTEUR qui répondait "...l'on est tenté de croire à un microbe "d'une petitesse infinie,..." En 1881, PASTEUR émet l'hypothèse d'un germe invisible et incultivable, à l'origine de la rage. [illegible] virulence constante du système nerveux des animaux enragés et sa [illegible] microbiennes, il en déduisait que "tout virus est un microbe" (1889).

IWANOWSKY (1892) démontra l'existence [illegible] de mosaïque du Tabac.

Mais c'est à LOEFFLER, par ses études sur le virus aphteux, que revient le mérite d'avoir déterminé les caractères principaux des virus filtrants. Le virus de la fièvre aphteuse est, en effet,

le premier virus d'origine animale mis en évidence. LOEFFLER & FROSCH (1898) ont prouvé que la lymphe d'aphtes de bovins atteints de fièvre aphteuse, filtrée sur porcelaine, donc exempte de microbes visibles, reporduit la maladie. Ils démontraient, à la fois, l'étiologie de la fièvre aphteuse et la réalité des ultravirus.

Des travaux experimentaux sur la fièvre aphteuse et son virus ont été entrepris dans le monde entier et leur nombre est considérable. Malgré tout, la connaissance du virus aphteux s'affermit lentement, étant donnée la difficulté de sa culture en masse. Au fur et à mesure de la mise au point de nouvelles techniques physiques, chimiques ou biologiques, l'étude du virus progresse. Toutefois, malgré la qualité des travaux et les résultats acquis, le problème du virus aphteux, comme celui de tous les virus, est d'une grande complexité. L'étude du virus aphteux est difficile : il ne peut être décelé que par son rôle pathogène. C'est l'un des plus petits virus et l'un des plus mal connus. Nous devons reconnaître notre ignorance sur bien des points.

L'observation des épizooties de fièvre aphteuse sur le terrain, l'expérimentation du virus aphteux au laboratoire, ou la lecture de la bibliographie, permettent [illegible] grandes lois de la Nature et à son instabilité, elles sont, jusqu'à nouvel ordre, plus biologiques que mathématiques. Nous savons que notre travail ne sera qu'un aspect "figé" d'un moment de l'évolution incessante du virus aphteux et des découvertes dans son domaine.

Notre étude, proprement dite, du virus aphteux [illegible] renseignements indispensables à la connaissance du virus aphteux [illegible] & LECLAINCHE (1903), le livre de VALLEE (1924), les traités de BAUDUROY (1934), [illegible] (1936), PANISSET (1938), LEVADITI, LEPINE & VERGE (1943).

[illegible]

[illegible] vétérinaire grec aurait parlé des "maladies aphteuses" (selon HUZARD, 1793) et, au XVIème siècle, quelques Français et Italiens commencent à découvrir les aphtes chez les animaux malades.

Pour la première fois avec certitude, une épizootie de fièvre aphteuse, celle de 1514, est décrite par Fracastoro [illegible] (1546) dans son livre "De contagione et contagiosis morbis curatione" où il relate les lésions buccales et podales qu'il a observées :
"...nous rappellerons la contagion extraordinaire de l'année 1514 "qui attaqua les boeufs [illegible] et qui fut d'abord observée dans "la contrée de Fréjus, d'où elle passa ensuite dans celle de Padoue " et de là dans notre pays ([illegible]). D'abord le boeuf s'abstenait "de manger sans cause apparente ; les bouviers, en regardant dans "la bouche, voyaient d'abord quelques aspérités, puis de petites pus- "tules sur le palais et dans toute la bouche. Il fallait aussitôt "séparer la bête infectée du reste du troupeau, autrement la conta- "gion gagnait tout le troupeau, peu à peu la maladie descendait dans "les [illegible] et dans les pieds [illegible] lesquels ce changement se "faisait étaient [illegible], la plupart de ceux chez les- "quels elle ne [illegible] point [illegible]...."
([illegible] d'ERCOLANI, 1558).

D'après LECLAINCHE c'est la fièvre aphteuse que WINCLER [illegible] médecin du [illegible], en [illegible] en Italie, Suisse, Allemagne, Pologne : "La maladie avait [illegible] "de 2 milles en 24 heures sans épargner une seule paroisse [illegible] "chemin". En 1686, nouvelle épizootie en Allemagne relatée [illegible] DIDERICH : les animaux malades bavaient abondamment "comme les sy- "philitiques que les vieilles [illegible] de Hambourg traitent avec le "[illegible]".

[illegible] vres et porcs, et la virulence du lait. La même année, la maladie sévit en Auvergne et aux environs de Paris (GUERSENT), [illegible] BARAILLON l'observe dans la Généralité de Moulins (1767) et LAFOSSE fils ([illegible]) [illegible] parisienne. [illegible] le fondateur des Ecoles Vétérinaires, s'intéresse au traitement de 530 bêtes à cornes atteintes dans cette épizootie ; au traitement ancien, qu'il juge [illegible] "la langue avec une [illegible] d'argent jusqu'à effusion "de sang et bassiner deux [illegible] avec un "mélange de vinaigre, [illegible], d'ail et de [illegible] "pilés...." il conseille [illegible] fréquentes sur [illegible] l'aide de boissons [illegible] et l'évaporation de vinaigre sur des charbons ardents, dans les étables ; il [illegible] les saignées

C'est en 1808 (1) que TOGGIA donne le nom de fièvre [illegible] lique aphteuse et contagieuse des bêtes à cornes [illegible], plus [illegible]

---

(1) D'après une communication de TOGGIA à BUNIVA, in BARBERET, BUNIVA [illegible] Recueil de Mémoires et Observations sur l'Epizootie, Paris 1808, p. 172.

plement : fièvre aphteuse (febbre aftosa) en 1810 (1) à la maladie qui sévit, de 1809 à 1811, en France, [illegible] Italie. Il [illegible] sous lequel il avait décrit les épizooties du Piémont en 1799 et 1800 et rejette, avec raison, les noms de vajuolo (petite vérole de la vache) et de mal del rospo (crapaud) qui lui étaient souvent donnés. Il donne une description clinique remarquable de la maladie.

HUZARD Père (1810) fut envoyé par le Gouvernement, dans la Vallée d'Auge, étudier et prendre des mesures sanitaires pour arrêter le cours d'une épizootie aphteuse. Celle-ci s'étend un peu partout dans l'Empire jusqu'en 1812. En [illegible], [illegible], médecin à Meulan, fait présenter par [illegible], vétérinaire, un mémoire à la Société d'Agriculture sur une maladie des vaches ; à la description il est aisé de reconnaître la fièvre aphteuse. [illegible] chef du département des Vosges ([illegible]) établit l'identité étiologique des diverses localisations des aphtes : bouche, onglons, mamelles, rumen. SIMONDS, en 1839, fait le premier diagnostic de fièvre aphteuse dans le Surrey (Angleterre). Les travaux français de MATHIEU & REYNAL ([illegible]) sont les premiers à citer, en France, le nom de fièvre aphteuse, maladie souvent confondue, auparavant, avec la peste bovine, le charbon etc.... La fièvre aphteuse est connue alors sous les noms de : maladie [illegible], [illegible], bouche chancrée, chancre volant, [illegible], mal de la bouche, ulcère, glossanthrax, [illegible] interphalange. Ces dénominations anciennes [illegible] surtout deux localisations des aphtes : la bouche et les membres ; elles sont conservées dans les expressions anglaise (foot-and-mouth disease), allemande (Maul-und-Klauenseuche) et scandinave ([illegible])..... [illegible] teuse est parfois désignée sous le nom d'aphtes épizootiques.

Partisans de la contagion et de la non-contagion s'affrontent jusqu'en 1858, moment où [illegible] prend nettement position pour la contagion. NOCARD (1878), à l'occasion d'une petite épizootie de fièvre aphteuse observée à l'Ecole d'Alfort, insiste sur la gravité de

---

(1) Istoria e cura delle malattie più famigliari de'buoi 2ème Edit. Turin 1810, T.1, p. 2[illegible].

cette maladie et sur les mesures prophylactiques préconisées par REED.

Viennent alors les grandes dates de l'histoire expérimentale du virus de la fièvre jaune :

1900 – preuve de son existence dans le sang et possibilité de [illegible] (REED [illegible]), [illegible] transmission [illegible] [illegible] [illegible]

[illegible] – [illegible]

[illegible] – sa présence [illegible] dans le sang à la première période de la maladie [illegible]

[illegible] – sa conservation aux [illegible] [illegible]

[illegible] – sa [illegible] [illegible]

[illegible] – [illegible] [illegible]

[illegible] – [illegible] sur tissus de Cobaye, [illegible]

[illegible] – son adsorption sur hydroxyde d'aluminium (PYL, puis [illegible])

[illegible] – [illegible]

[illegible] – [illegible] vaccin [illegible]

[illegible] – son observation au microscope électronique [illegible] puis par [illegible], GIRARD, [illegible], PASCAL [illegible]

[illegible]

[illegible] des substances [illegible]

La question n'est pas résolue car il s'agit d'un très petit virus formé probablement d'une molécule unique de nucléoprotéide à masse

moléculaire importante. Le fait de n'avoir pas obtenu [illegible] des autres virus animaux (1) qui ont été isolés à l'état [illegible] BOIVIN (1941), un critère, car la facilité de cristallisation varie beaucoup d'une protéine à l'autre ; ce qui paraît le plus important est le fait qu'un virus peut avoir une molécule isolée comme unité virulente.

Les virus se placent, par leurs dimensions et leur constitution chimique, entre la matière inanimée et les plus simples êtres vivants : les bactéries (Tableau de GORET & JOUBERT, échelle arithmétique des tailles, 1947). (Echelle des logarithmes des volumes des êtres vivants, tableau de LEPINE & STRUNGE, 1950).

LOEFFLER admettait que le virus aphteux était un agent figuré vivant qui se reproduisait dans le corps des animaux et non une substance en dissolution comme une toxine (1898). L'activité pathogène d'une lymphe se conserve malgré la dilution et l'injection répétées [illegible] virulente du virus d'origine de 1 : 2 1/4 trillions. De plus, la lymphe passée à plusieurs reprises sur un filtre très serré de Kitasato, n'est plus susceptible d'infecter : l'agent pathogène est retenu sur le filtre. Le virus possède certains caractères des êtres vivants [illegible] reproduction. Cependant, dès 1927, OLITSKY & BOEZ ne peuvent déterminer si le virus aphteux est un élément chimique inanimé ou un corps vivant capable de se multiplier, il leur paraît que le virus est particulaire et vivant et non liquide comme le voudrait la théorie du *contagium vivum fluidum* de BEIJERINCK.

JANSSEN (1934) en se basant sur deux caractères du virus aphteux : impossibilité de sa culture dans les milieux ordinaires de bactériologie et sa grande chimiorésistance, le considère déjà, avant les expériences de STANLEY, comme une substance chimique protéique vivante. Il confirme son hypothèse en purifiant le virus aphteux (1936) comme une protéine normale par les méthodes de précipitation de la chimie des protéines. Par d'autres purifications, par adsorption et élution, il désagrège, de façon réversible ou irréversible, selon le [illegible]

(1) sauf, peut-être, par BOSTIAN (1950) en U.R.S.S., mais [illegible] la concernant.

reste actif malgré les [illegible] qui [illegible] au [illegible] état de culture vivante. En 1937, [illegible] démontre que le virus aphteux est une nucléoprotéine et [illegible] n'est en [illegible] vivant. [illegible] (1937) est [illegible].

Pour HECKE (1937) le virus aphteux ne peut pas se [illegible] micro-organismes connus : un des plus petits [illegible] dimensions correspondent à celles des molécules [illegible] [illegible] il se trouve. Il ne peut être décelé que [illegible] [illegible] et immunisante. Il existe trois types de virus aphteux [illegible] immunisent entre eux ; ils ne cultivent [illegible] cellules vivantes. Les méthodes d'études chimique et physique [illegible] être [illegible] et les travaux considérant le virus [illegible] une substance inanimée devraient être profitables.

[illegible] virus aphteux [illegible] pour l'éliminer des êtres vivants. [illegible] (1946) [illegible] petits virus les deux hypothèses : virus = corps [illegible] et virus = substance chimique, aboutissent à des conclusions [illegible]. "Le virus est-il une sorte de petit microbe doué [illegible] "ou une substance chimique d'une qualité supérieure [illegible] [illegible] nucléoprotéines la notion [illegible].

[illegible] l'origine actuelle des ultra-virus deux idées [illegible] [illegible] :

[illegible] les virus sont d'origine exogène, ils [illegible] l'extérieur, selon le dogme pasteurien,

[illegible], les ultravirus [illegible] proviendraient des cel[illegible] [illegible] tion [illegible] [illegible]

2) PROPRIETES du VIRUS APHTEUX

Définitions :

Autrefois "virus" désignait les agents infectieux en général. Afin d'éviter toute équivoque, nous l'emploierons, au cours de ce travail, dans le sens étroit [illegible] tendance à avoir maintenant. Les virus s'opposent ainsi aux bactéries et aux protozoaires. Le virus aphteux est, essentiellement, une particule, un <u>corpuscule élémentaire</u> qui représente [illegible] en matière de virus l'unité infectante.

Il nous est nécessaire de définir ce que, tout au cours de notre exposé, nous [illegible] pratiquement par virus aphteux. Le matériel vi[illegible] le "virus" n'est pas un produit par au sens chimique [illegible] mais un mélange complexe, mal défini, et pas [illegible] à lui-même : c'est une certaine quantité de <u>corpuscules aphteux</u> entourés des constituants des cellules où ils ont cultivé : protéines non spécifiques, lipides, glucides, sels minéraux, bactéries... Le virus est, peut-être, sous des formes différentes selon les tissus d'où il provient ; pour VALLEE, le virus du sérum et celui des aphtes ne sont pas identiques, le premier est plus favoreble aux essais de culture <u>in vivo</u> que le second. Au moment du prélèvement les corpuscules ne doivent pas être tous identiques mais à [illegible] différents de leur évolution.

Le "virus aphteux" se trouve dans la lymphe des vésicules aphteuses ou parois des aphtes. Il est possible de récolter, stérilement, la ly[illegible] aphteuse des aphtes non rupturés ou de prélever [illegible] sang à la période d'élévation thermique. Ces produits virulents sont inoculés tels quels, ou après dilution

Dilution :

Le virus aphteux s'extrait, pour les manipulations courantes, par écrasement des cellules du tissu infecté lavé (aphtes) à l'aide d'un broyage et d'une suspension convenable pour permettre au vi[illegible] de passer, en plus grande quantité possible, dans [illegible] liquide physiologique, il doit, alors, se disperser en molécules isolées

La dilution est la méthode la plus élémentaire pour étudier le virus ; elle est la base nécessaire de toutes ses manipulations. Dès le broyage des tissus où il

est englobé, le virus doit être suspendu en milieu liquide : eau distillée ou, mieux, eau physiologique tamponnée aux phosphates à pH 7,6. Nous verrons que le titrage est basé sur l'activité de dilutions progressivement croissantes. La dilution est nocive, même si toutes les conditions de température, de pH, entre autres, sont respectées ; le virus aphteux [illegible] d'eau est très fragile, surtout après filtration. La quantité d'eau distillée nécessaire pour épuiser le virus contenu dans les aphtes est de 15 fois (WALDMANN) ou de 12 fois ([illegible]) le poids initial des aphtes.

Les débris cellulaires, source de graves erreurs, doivent être éliminés, par filtration ou centrifugation.

Purification :

Afin de faire correctement certaines études : constitution, dimensions, morphologie [illegible] du virus [illegible], il est nécessaire d'obtenir des corpuscules [illegible] débarrassés des diverses substances [illegible]. Cette purification doit [illegible] le [illegible] du virus.

Procédés physiques : La centrifugation, 2 heures à 5.500 tours-minute, ne suffit pas [illegible] le virus aphteux ([illegible], 19[illegible]).

GALLOWAY & ELFORD (1936) purifient le virus aphteux par ultrafiltrations [illegible] sur membranes de collodion d'une suspension en liquide tamponné à pH 7,6. La virulence est conservée bien que la suspension ne paraisse plus contenir de protéines. La conservation *in vitro* serait [illegible] par rapport [illegible] virus non purifié et il y aurait proportionnalité entre le temps de conservation et le degré de pureté ; mais il est plus sensible à l'action de l'alcool et du [illegible]. Les virus purifiés ou non ont le même comportement vis-à-vis de l'ultrafiltration ([illegible], 19[illegible]). GALLOWAY & [illegible] (19[illegible]) ultracentrifugent, sur supercentrifugeuse Sharples, puis ultrafiltrent sur des membranes de collodion de 25 mμ ; ils obtiennent un virus très purifié. Par adsorption sur différentes substances, puis élution [illegible], la purification du virus aphteux est réalisée par [illegible] (19[illegible]). Le virus purifié conserve ses propriétés.

Procédés chimiques : JANSSEN (19[illegible]) purifie le virus aphteux en le précipitant dans une [illegible]. Dans une lymphe aphteuse il sépare, par précipitation, le virus, de l'albumine et de l'oxyhémoglobine par le sulfate de [illegible] à 50 p. 100 (saturation) ou le sulfate d'ammonium à [illegible] p. 100 (saturation) ; le pouvoir infectieux est conservé. Par une seconde technique, à l'aide de chlorure de sodium et d'alcool-éther, il sépare, sous forme de précipité rouge, le virus, de l'albumine du sérum et d'une partie des globulines ; le précipité virulent contient le reste des globulines et l'oxyhémoglobine.

Dans un même essai de purification, JANSSEN ajoute, à une lymphe aphteuse tamponnée aux phosphates et conservée à -15°, de la glycérine et de l'alcool-éther. Le précipité qui se forme contient une fraction des globulines et la protéine aphteuse, il est virulent par voie intradermique chez le Cobaye ; par voie sous-cutanée il n'infecte pas, mais vaccine le Cobaye. Les mêmes essais, sur le Porc, sont négatifs.

Dans ces trois purifications, le virus ne peut être isolé complètement d'une partie des globulines et il ne peut être cristallisé par la méthode de STANLEY. HOBOHM (1940) précipite le virus d'un sérum par l'acétone ou le sulfate d'ammonium. Le précipité ~~soluble~~ est infectant.

Procédés physiques et chimiques : Afin d'obtenir un virus pur, JANSSEN ([illegible]) emploie l'adsorption et les précipitations.

Ses premiers essais d'adsorption par précipitation dans la solution virulente de collodion sont négatifs. Il réussit avec une solution virulente de SO_4Ca à saturation, puis addition d'alcool à 20 p. 100, ou d'alcool-éther, à précipiter SO_4Ca qui entraîne le virus aphteux. Le culot de centrifugation est dissous par de l'eau, on retrouve ainsi le virus virulent sans altération ; il existe toujours un peu de globulines avec le virus. Une petite quantité de cystéine, ou de SO_3Ca, ne gêne pas l'adsorption, mais une grande quantité de cystéine entraîne la précipitation de SO_4Ca. Pour purifier plusieurs fois de suite, JANSSEN élue avec SO_4Ca saturé, ou PO_4HNa_2 et oxalate d'ammonium, au lieu de dissoudre le précipité dans l'eau. L'élution avec Cl_2Ba est défavorable, ainsi que l'agitation à l'air.

Une solution de SO_4Mg à 0,2 p. 100 contenant le virus, traitée par un mélange glycérine-alcool-éther, donne un virus purifié insoluble et virulent qui peut servir de vaccin.

Tous ces procédés physiques et chimiques permettent une purification assez poussée, mais non absolue, du virus aphteux, car les produits de broyage des tissus contenant le virus renferment aussi un matériel non infectant, mais ultracentrifugeable, ultrafiltrable, adsorbable, tels que les éléments cellulaires, microsomes, granules de protéine ..., dont certains ne sont guère plus gros que le virus aphteux.

Toutefois, JANSSEN (1941) aurait atteint l'état de pureté chimique du virus aphteux car, nous le verrons à l'étude de la composition chimique, il a réussi à l'isoler sous l'état d'une nucléoprotéine.

Concentration :

Il est quelquefois intéressant de concentrer le virus pour avoir une solution très riche ou pour pouvoir le déceler dans une solution trop pauvre.

L'enrichissement d'un liquide, en virus aphteux, est réalisé par toutes les méthodes de purification; [illegible] l'obtient facilement en ultrafiltrant une solution virulente sur des membranes très serrées retenant le virus aphteux. Mais la méthode est lente car il est nécessaire, dans ces essais d'enrichissement, de manipuler une grande quantité de liquides.

La purification par la méthode de GALLOWAY et SCHLESINGER (ultracentrifugation, puis ultrafiltration) peut être suivie de la concentration à l'aide [illegible] de collodion acétique à 9 p. 100. En un jour une lymphe d'un titre de 10^{-6} a pu être concentrée à 10^{-8}.

JANSSEN & [illegible] par leurs méthodes de purification, enrichissent leur solution virulente. [illegible] l'enrichissement du virus aphteux dans des solutions "sous infectieuses" (renfermant une quantité de virus non décelable par l'inoculation) : dilution en liquide physiologique, urine; par adsorption sur charbon, kaolin ou hydroxyde d'alumine, le titre du virus peut être multiplié par 1.000, et l'existence du virus prouvée, malgré une dilution de 1.10^{-7}.

Avec le sérum, ces méthodes échouent ; le virus peut cependant être enrichi par adsorption sur un précipité d'albumine provoqué par l'acétone.

A) PROPRIETES PHYSIQUES

a) Constitution physique :

Morphologie des corpuscules élémentaires :

"Qui dit microbe "invisible" devrait dire microbe "invu" " (VALLEE, 1923).

La forme des corpuscules élémentaires aphteux commence à être entrevue au microscope électronique. Avant d'arriver à ce stade, il s'est écoulé trois périodes bien différentes :

La première s'arrête en 1898 ; sous l'influence des idées pasteuriennes, on a voulu trouver, au microscope optique, un germe responsable de la fièvre aphteuse. HADINGER (1865) trouve un champignon, de même que FLEMMING (1869), SPINOLA (1870) et ZURN (1875). Pour BENDER (1869), KITT (1884) et RIVOLTA (1885) c'est un microbe ; un microcoque ; NOSOTTI (1885) le retrouve et le cultive ; il s'atténue rapidement. KLEIN (1885) et KURTH (1893) isolent un streptocoque ; BEHLA (1894), PIANA & FIORENTI (1895) des amibes. SIEGEL isole un microbe polymorphe d'une épidémie de stomatite humaine coïncidant avec une épizootie de fièvre aphteuse. STARCOVICI (1896), JONES (1897) décrivent un bacille dont l'inoculation produirait la maladie.

NOCARD (1897) réfute toutes ces affirmations car les microbes décrits perdent leur virulence quand, par cultures successives, ils se trouvent séparés de la lymphe virulente qui les souille. De plus, les germes tuent les animaux, ce qui n'arrive jamais par l'injection de lymphe aphteuse. CHAUVEAU (1897) constate que la sérosité des aphtes ne cultive pas, quoiqu'elle donne, toujours, la maladie par inoculation.

Les seuls travaux modernes ayant trait à la présence d'un germe figuré sont tous relatifs à la présence d'un microcoque de 1 µ, gram positif, très fin, trouvé d'abord par VAN BETEGH (1911) puis par LOMBARDI (1936) au niveau des lésions du myocarde, des ganglions et des divers parenchymes d'animaux morts de fièvre aphteuse. Ces travaux ont été confirmés par HEINIG (1939). GEERDS (1939) a retrouvé un germe identique et l'a passé sur cobayes. Nous avons cultivé sur bouillon et sur gélose ordinaire un tel microcoque que nous avons, personnellement, isolé dans le coeur "tigré" d'une vache morte de fièvre aphteuse (N° 724 - Exp. 15), après avoir servi au titrage (10^{-2}) d'un virus de culture sur foetus en survie expérimentale. S'agit-il d'une agglutination de corpuscules aphteux, d'une forme figurée du virus aphteux, ou d'un germe de sortie ? Nous ne pouvons répondre, la constance de ce germe n'étant pas assez fréquente dans les lésions aphteuses.

La deuxième période est celle des notions de l'invisibilité et de la filtrabilité du virus aphteux.

Elle dure de 1898 à 1940. Les constatations de LOEFFLER, FROSCH & [illegible] démontrent qu'aucun des germes décrits n'est l'agent de la fièvre aphteuse. La raison en est simple : la lymphe recueillie dans les vésicules non rompues est limpide et stérile à l'examen direct et aux ensemencements, or, à ce moment, elle est très active ; elle renferme quelques cellules lymphatiques, des hématies et des granulations très réfringentes, de tailles variables, quelques unes à peine perceptibles. Plus tard, la lymphe se trouble, contient des germes divers et devient inactive.

[illegible] LOEFFLER & FROSCH, dans le but d'immuniser les animaux avec la lymphe aphteuse [illegible] qu'elle pouvait contenir, eurent l'idée de la filtrer sur bougie, méthode considérée, jusqu'alors, comme le meilleur moyen de stérilisation. A leur grande surprise, le liquide filtré fut virulent (PANISSET, 1914). LOEFFLER & FROSCH confirment la présence d'un agent invisible : une dilution de lymphe au 1/40 [illegible] est filtré sur une bougie en terre d'infusoires ; le filtrat en[illegible] rescens a été arrêté par le filtre ; or 1 cc. de ce filtrat injecté dans la veine d'un veau lui donne la fièvre aphteuse. Le filtrat, passé successivement sur trois bougies, reste virulent, bien qu'optiquement vide. L'agent virulent est invisible, il est si petit qu'il passe à travers les bougies, mais il existe et a une structure car il est arrêté par un filtre Kitasato dont les pores sont plus fins. Autre preuve : il ne s'agit pas d'une toxine [illegible] infectés car, par de petits prélèvements sur ceux-ci, d'autres animaux peuvent être infectés [illegible]

Par différents artifices indirects on a tenté de voir ce virus

par surcoloration après [illegible] tte technique consiste à accroître, dans des [illegible] considérables, la taille des [illegible] visibles au microscope optique, BORREL (1932) réussit, par fixation à l'acide osmique, mordançage au tannate de fer et surcoloration à la fuchsine phéniquée à chaud, à reconnaître la présence de corps élémentaires (Borreliota de GOODPASTURE) dans la plupart des maladies à virus. Dans la lymphe et les cellules de l'épiderme d'aphtes de cobayes, ainsi que dans une culture du virus aphteux, BORREL colore des "granulations en nombre immense "qui pourraient bien être les granulations virulentes et qui ne [illegible] de véritables colonies. Ces travaux, remarquables pour l'époque,

n'ont pas été suivis, mais il faut admettre, au point de vue historique, la similitude entre les photographies et dessins publiés par BORREL et les photographies électroniques actuelles, mise à part, bien entendu, la dimension des granulations : trop grosses et déformées par l'excès de colorant. Une technique voisine, à base de bleu Victoria, a donné des résultats semblables à [illegible] (19[illegible]).

BECHOLD agrandit l'image des corpuscules en ajoutant, à la suspension virulente, du chlorure d'or qui s'accole au virus, il calcine la préparation et réduit le chlorure d'or en or colloïdal. Par l'examen à l'ultramicroscope, il établit une différence de taille entre les types C ([illegible] mµ) et A (40 mµ). Cette méthode est sujette à caution.

par examen au microscope [illegible] et photographie en ultraviolet : ce procédé de BARNARD (1937) utilise une lumière de courte longueur d'onde (première prévision de ROUX, 1903) et permet l'obtention de photographies de corps d'environ 40 à 100 mµ ; les plus gros sont sphériques, réunis en chaînettes et plus fréquents dans les lésions [illegible] BARNARD [illegible] les plus petites données par [illegible] ultrafiltration correspondent [illegible] mais qu'il n'est pas interdit [illegible] qu'il existe des corpuscules spécifiques [illegible].

par microscope à fluorescence : la suspension de virus aphteux [illegible] colorant fluorescent, est examinée au microscope à rayonnement ultraviolet. Les corpuscules émettent une nouvelle longueur d'onde visible. GERLACH (1938) observe ainsi, dans la lymphe aphteuse ou [illegible] cellules infectées, des corpuscules très petits isolés ou réunis en chaînettes, anneaux..... Il admet leur spécificité car il ne les retrouve pas dans les préparations témoins.

La troisième période commence avec la réalisation du microscope électronique (deuxième prévision de ROUX). On peut espérer voir le virus aphteux : les électrons remplacent les rayons lumineux.

En 194[illegible], [illegible] publient une première photographie, bien imprécise il est vrai, d'une suspension de virus aphteux. Ils diluent la lymphe d'aphtes de cobayes et la centrifugent à 15.000 tours-

minute. Ils appliquent la technique sans ombrage qui leur avait [illegible]
[illegible]
[illegible] de forme imprécise, d'environ 20 à 30 mμ. L'activité virulente de leur préparation n'est pas signalée.

Dans des broyages d'aphtes filtrés actifs à 10-6 (type O) et dans du liquide allantoïdien de 2ème passage sur oeuf de virus type O, BERNARD, GIRARD, HIRST, MACNAIAN & LORRIN (1949) ont montré la présence d'éléments corpusculaires de 12 à 30 mμ de diamètre, que ces auteurs considèrent comme le virus aphteux. Les photographies, publiées au 1er Congrès de microscopie électronique (Paris 1950), semblent réellement étayer leur démonstration. Ils ne trouvent rien de semblable dans des préparations témoins : [illegible]
Le virus frais semble exister en amas, ou en chaînes, formés de l'agglutination d'éléments sphériques. La lyophilisation, suivie de remise en suspension, provoque l'augmentation du volume des amas. Le pH joue un rôle certain, à 7,4 le virus est en sphérules [illegible]
en groupements d'innombrables particules. Cette constatation ex- [illegible]
[illegible] : en solution tamponnée le virus filtre, en solution non tamponnée les gros amas sont retenus sur le filtre, le filtrat est avirulent (constatation que nous avons, nous-même, observée).

Recherches personnelles

Il nous a semblé intéressant de rechercher, dans divers matériels virulents provenant d'espèces différentes, les éléments spécifiques décrits par les expérimentateurs précédents. Dans cette étude, nous avons utilisé 2 types de virus de la collection du Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires : O (vache, porc, cobaye) et C (vache)

Nos expériences ont pu être entreprises grâce à l'obligeance du Docteur DESSIS et de son assistant M. BRICKA qui ont mis à notre disposition, avec leur compétence et leur technique, un microscope électronique C.S.F. qui peut donner, à l'observation directe, un grossissement de 10.000. J. GORIUS, Léone SALOMON et J.-Paul THIERY nous ont aidé dans la réalisation de ce travail.

Les préparations ont été étalées sur lames, ombrées aux vapeurs d'or et reprises sur "formvar".

Lymphes :

Pour éviter toute modification des éléments virulents nous avons d'abord examiné de la lymphe d'aphtes, produit de haute virulence et très concentré [illegible]

[illegible] lymphe contient [illegible] éléments cellulaires non spécifiques [illegible].

L'examen de 9 lymphes [illegible] dans les aphtes de [illegible] (8 [illegible] avec le virus type O bovin [illegible] avec le type [illegible] bovin), de coussinets de 2 cobayes (type [illegible]) et de groin d'un porc (type O bovin) a [illegible] électronique, la présence [illegible] sphériques, bien individualisés, [illegible] différentes [illegible] de tailles supérieures qui paraissent résulter [illegible] des plus gros corpuscules [illegible].

L'étude d'une lymphe de [illegible] mêmes espèces [illegible] montre des [illegible] à 20 mμ en très grande abondance et quelques [illegible] granules de taille supérieure. La comparaison [illegible] ces deux photographies fait ressortir, dans le [illegible] virulent, une plus grande concentration en corpuscules de 20 mμ (± [illegible]).

La dilution au 1/20 de [illegible] eau physiologique tamponnée aux phosphates [illegible] tout en conservant leur [illegible] plus [illegible], les corpuscules [illegible] tachent sur un fond plus uniforme.

Après filtration sur Seitz EKS ou centrifug[illegible] (3.000 tours-minute [illegible]) [illegible] nous donnent des images comparables.

[illegible] d'aphtes.

[illegible] d'aphtes [illegible] de [illegible] sont [illegible] eau physiologique [illegible] gées et filtrées sur Seitz [illegible]. Le filtrat est virulent : son examen, au microscope électronique, [illegible] corpuscules de [illegible] en granules de 10 à 20 mμ qu'[illegible] retrouve [illegible] broyats cellulaires [illegible].

[illegible]

Ce matériel, [illegible] inoculé de fièvre aphteuse, est connu depuis très longtemps pour sa haute virulence. Il présente [illegible] par rapport à la lymphe d'aphtes, d'être un liquide organique pratiquement [illegible] d'éléments cellulaires, ce qui permet l'observation directe, sans filtration ni centrifugation. [illegible], il a l'avantage d'être recueilli loin du point d'inoculation, ce qui lui confère des qualités de pureté et de spécificité.

Ce liquide est prélevé sur un porc au moment de la générali-sation de la maladie, en présence d'une solution de citrate de sodium. On retrouve, au grossissement de 10.000, des images ana-logues à celles de la lymphe diluée, avec les mêmes corpuscules de 50 mμ qui sont, pratiquement, absents dans le liquide péricardique citraté de porc indemne.

Le fond de ces préparations, témoins et infectées, est iden-tique ; il est constitué de granules de tailles variables dont les plus gros atteignent 20 mμ.

Etant données les difficultés de concentration et de purifi-cation du virus aphteux, nous avons tenté d'aborder le problème de la spécificité aphteuse des corpuscules observés, par des voies différentes.

C'est ainsi que nous avons été amené à examiner :

- du liquide de brûlure faite sur une langue de vache en évolu-tion aphteuse,
- de la lymphe aphteuse en présence de sérum anti-O,
- des stromas d'hématies de vache en évolution aphteuse,
- des stromas et [illegible] d'hématies de vache saine, mis au contact de la lymphe aphteuse.

L'observation du liquide de brûlure d'une langue présentant, en région postérieure, des aphtes primaires, permet de retrouver les mêmes granules, mais en très petit nombre. Ce liquide est vi-rulent pour le cobaye. [illegible] ont déjà montré, en 1934, la virulence d'un tel matériel pour le bovin. Les corpuscules sont absents de la lymphe de brûlure de vache saine.

[illegible] de la lymphe aphteuse [illegible], du sérum anti-O [illegible] examinée au micros-cope électronique. Sur les photographies, les corpuscules déjà décrits se présentent agglutinés en amas, plus ou moins importants, pouvant atteindre une taille de l'ordre du μ.

On trouve quelques corpuscules libres sur le fond de la pré-paration. Aucun élément ne nous permet d'affirmer la spécificité [illegible]. Nous livrons ce fait tel que nous l'avons constaté. Il est bien connu que des sérums normaux agglutinent des germes [illegible].

La comparaison de stromas d'hématies de vache aphteuse préle-[illegible] montre un [illegible] sur les stromas aphteux, alors que les témoins en sont exempts.

A l'extérieur des stromas on retrouve un certain nombre de corpuscules non adsorbés.

Les stromas sont préparés par une série de lavages à l'eau dis-tillée ou hémolysés à la saponine, dans le but de les rendre obser-vables au microscope électronique, car l'hématie entière ne laisse pas passer les rayons électroniques.

Fixation sur hématies normales :

Comme l'ont montré VALLÉE & CARRÉ (1921), des hématies de boeuf lavées "après agitation et contact de "quelques instants avec le liquide filtré sur bougie "Chamberland d'un broyage d'épithélium d'aphtes, fi- "xent en abondance les éléments encore inconnus de "la virulence aphteuse".

Nous avons renouvelé ces expériences, la seule différence [illegible] d'hématies normales. Celles-ci sont d'abord hémolysées comme précédemment puis mises en contact avec de la lymphe aphteuse. On retrouve [illegible] grand nombre que précédemment [illegible] adsorbée sur les stromas. L[illegible] -teuse aux stromas entraîne presque toujours [illegible] glutination qui rend inutilisables ces préparations pour l'examen au microscope électronique. Nous n'avons pu obtenir de bons étalements à partir des stromas humains ou aviaires, mais avec les hématies de bovin normal nous avons eu quelques clichés convenables. Pour éviter l'agglutination, les hématies de vache, non hémolysées, sont mises au contact de la lymphe, puis étalées, non fixées, elles sont alors ombrées et reprises sur "formvar" afin d'obtenir leur empreinte (1).

Les images obtenues confirment les observations [illegible] -dentes et la présence de corpuscules assez gros. Dans aucune des préparations té[illegible] nous n'avons retrouvé ces corpuscules.

Dans tous les cas, la virulence des hématies, comme celle des stromas mis au contact d'un liquide virulent a été confirmée par inoculation à des animaux réceptifs.

Conclusion :

[illegible] avons retrouvé, avec une constance remarquable et en grande quantité, les corpuscules de 56 mμ (± 10) dans certains matériels virulents : lymphe d'aphte, li- [illegible], broyage d'épithélium aphteux de types [illegible] provenant d'espèces diverses. Il com- [illegible] que plus [illegible] filtrat [illegible] mes sont importants ([illegible]).

Les corpuscules observés par l'École de Lyon s[illegible]

---

(1) Méthode de [illegible] & [illegible]. Arch. Anat. Micros. et Morph. Exp. 1949, 38, 190.

olent correspondre [illegible] au virus aphteux : les nôtres sont trop gros, mais il s'agit peut-être d'éléments spécifiques agglutinés puisque leur observation coïncide toujours avec la virulence.

Nous ne pouvons pas affirmer que ces corpuscules représentent spécifiquement le virus aphteux dont la taille, évaluée par ultracentrifugation et ultrafiltration, oscille entre 10 et 20 mμ mais, dans les cas observés, ils accompagnent la virulence avec fidélité. Des observations ultérieures de virus purifié permettront, peut-être, de préciser s'il s'agit de réactions cellulaires propres au virus ou de la réunion de corpuscules élémentaires de virus.

Il est certain, par [illegible] que la <u>différenciation des corpuscules de 10 à 20 mμ [illegible] et spécifiques s'avère extrêmement difficile, puisqu'il [illegible] en quantité, des corpuscules de cette taille dans les liquides normaux</u> (par exemple le péricarde). Comment faire la preuve de la virulence de certains d'entre eux ? Bien plus, BESSIS a publié (1950) des photographies électroniques d'hématies (normales [illegible], agglutinées ou hémolysées) avec corpuscules analogues aux nôtres. LEVADITI a isolé d'ultrafiltrats de [illegible] toïdes n'ayant pas [illegible] virus vaccinal des corpuscules normaux de mêmes caractères, sauf la virulence, que les corpuscules vaccinaux. Les granules de Brachet (nucléo-protéines liées à des enzymes), les microsomes de Claude existent dans les cellules et peuvent en imposer pour des corpuscules élémentaires. LEVADITI a même pensé que certains de ces éléments servaient à l'élaboration d'unités virulentes, seraient, en somme, des pro-virus, comme il existe des pro-enzymes. Sous l'action d'un virus, ils s'activeraient en s'associant aux protéines normales pour dévier la synthèse des nucléoprotéines normales, et formeraient ainsi les virus. Quoiqu'il en soit, à cette échelle de 10 à 20 mμ, et [illegible] plus à 50 mμ, la présence de corpuscules normaux rend [illegible] toute détermination absolue du virus aphteux.

[illegible]

Les [illegible] ultramicroscope après agrandissement à l'or (20 à 40 mμ), photographies en lumière ultraviolette (50 mμ), microscope électronique (1[illegible] à 50 mμ) [illegible] les méthodes indirectes que nous allons envisager [illegible] : ultrafiltration (2 à 100 mμ), ultracentrifugation (20 à [illegible]), irradiation X (2[illegible]), irradiation α du radon (30 mμ à 10). Les chiffres extrêmes [illegible] 2 mμ et 100 mμ ; [illegible] résultats concordent pour attribuer au virus aphteux, quelque soit son type, O, A ou C, <u>une taille moyenne de 10 à 20 mμ</u>, [illegible] le plus petit de tous les virus pathogènes.

Il est d'une taille intermédiaire entre celle du bactériophage staphylocoque [illegible] (1[illegible] mμ) et celles de l'ovalbumine ([illegible] mμ x [illegible],6 mμ) et de l'oxyhémoglobine du cheval (2[illegible] mμ x [illegible],6 mμ). Il est plus petit que le virus de l'encéphalomyélite équine ([illegible] mμ), les gènes (125 mμ x 20 mμ), le virus de la peste aviaire (90 mμ) et celui de la vaccine (175 mμ). La souche neurotrope du virus aphteux de NAGEL & LÖFFLER a, d'après [illegible]-MAURY (1944) une taille supérieure à celle de la souche classique dermotrope : 65 mμ ± 10.

Les corpuscules aphteux sont-ils tous de la même taille, comme les méthodes d'ultrafiltration semblent le prouver, ou de tailles différentes, d'après certaines [illegible] électroniques ? On ne peut actuellement avoir une opinion ; par l'ultrafiltration seuls les corpuscules [illegible] d'une certaine dimension peuvent passer, et sur les images électroniques n'est-on pas abusé par des corpuscules [illegible] ou des corpuscules non spécifiques ?

La structure interne du virus aphteux est complètement inconnue et on ne peut qu'émettre l'hypothèse de l'architecture des nucléoprotéines, puisque le virus en serait une molécule, comme nous le verrons à l'étude de sa constitution chimique.

Poids :

Le poids d'un corpuscule aphteux a été calculé à [illegible].10^{-17} gramme par SCHLESINGER [illegible] [illegible] sé[illegible].

Poids spécifique :

Le poids spécifique [illegible] [illegible] environ [illegible] [illegible] [illegible] de [illegible]

Filtration :

[illegible] & FROSCH ont [illegible] le passage du virus aphteux à travers des [illegible] capables d'arrêter les bactéries [illegible] Chamberland. Le virus est arrêté par les pores plus fins du filtre Kitasato.

La filtration confirmée par ROUX & LOCARD (1902) est fonction de nombreux facteurs : structure des filtres, adsorption des parois, charges électriques des filtres et du virus, viscosité de la suspension, durée de la filtration etc..... OLITSKY & BOEZ (1927) ont étudié la filtration du virus aphteux en relation avec la porosité des bougies. Le virus traverse facilement les bougies Berkefeld V et N, Chamberland L_1, L_2, L_3, même L_4. A travers les bougies de plus fine porosité la filtration (à pH 7,5) est irrégulière, le virus passe une bougie L_7 sur 5, une L_9 sur 3 et aucune des 7 L_{11}.

Le rôle du pH est étudié par BEDSON, à pH 7,6 le virus passe à travers la bougie Chamberland [illegible], à pH 8,5 les bougies L_9 et L_{11} ne le retiennent pas. GIRARD et ses collaborateurs (1950) ont montré, au microscope électronique, la dispersion des corpuscules aphteux à pH 7,6, avec une bonne filtration sur bougie [illegible] et, au contraire, en eau distillée de pH acide, la formation d'amas de virus retenu sur une même bougie [illegible] le filtrat, dans ce cas, est avirulent.

Le filtre Seitz adsorbe 4 ou 5 filtrations successives si le virus est en liquide phosphaté à pH 7,6, mais le virus en tampon phosphaté à pH 8,5 traverse plus difficilement le filtre Seitz (GALLOWAY & NICOLAU). [illegible] a bien remarqué que les premiers centimètres cubes de filtrat ne contiennent qu'une très petite quantité de virus et que le taux maximum est atteint après la filtration de 20 à 30 cc. de suspension. Au cours de la filtration d'environ 40 cc. le titre peut être réduit de 5.10^{-6} à 5.10^{-3}. Nous avons vérifié ces remarques de [illegible] au cours de nos propres expériences.

A la suite de l'abaissement du pouvoir pathogène de nos dilutions virulentes, après filtration, nous avons été amené à comparer la diminution de la virulence de suspension après passages sur bougie Chamberland L_3 et sur filtre Seitz EKI.

Nos essais sont faits à partir de virus aphteux de type O (1). Les aphtes primaires et secondaires sont prélevés sur les coussinets plantaires de cobayes ayant eu une fièvre aphteuse généralisée en 48 h. Ils sont pesés (200 mgr.), broyés soigneusement au mortier en présence de silice (bouillie en eau distillée puis rincée à trois reprises dans l'eau distillée afin d'éliminer les impuretés). Le broyat est repris avec du liquide de J.-André Thomas à pH 7,6, de façon à obtenir une dilution de 1.10^{-2}. La suspension est centrifugée 10 minutes à 5.000 tours. Le liquide surnageant

---

(1) Toutes nos souches, sauf indication contraire, sont celles du Professeur VALLÉE conservées au Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort.

est dilué dans le même liquide physiologique jusqu'à 1.10^{-3}. Cette dilution est divisée en 3 parties : l'une sert de témoin ; la 2ème est filtrée stérilement sur bougie Chamberland L3 à l'aide d'un vide de 30 cm. de Hg ; la 3ème sur filtre Seitz EK dans les mêmes conditions. Nous n'avons pas lavé préalablement les filtres, ni éliminé les premiers centimètres cubes du filtrat. Les 3 parties sont alors titrées à 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} sur cobayes. Le coussinet plantaire gauche de chaque cobaye est inoculé par 1/4 à 1/2 cc. de filtrat dans l'épaisseur du derme.

TABLEAU N° 4

Préparation du virus	Dilution	Cobayes	Temps en heures après inoculation: 24	48	72	96
Suspension témoin non filtrée	1.10^{-3}	1	00	+OED	+OED	
		2	00	—	+OED	+OED
	1.10^{-4}	3	00	+OED	+OED	+OED
		4	00	+O	+O	—
	1.10^{-5}	5	00	00	00	00
		6	00	00	00	00
Suspension filtrée sur Seitz EK	10^{-3}	7	00	+OED	+OED	+OED
		8	00	00	00	00
	10^{-4}	9	00	00	mort	
		10	00	00	00	00
	10^{-5}	11	00	00	00	00
		12	00	00	00	00
Suspension filtrée sur bougie Chamberland	10^{-3}	13	00	00	00	00
		14	00	00	00	00
	10^{-4}	15	00	00	00	00
		16	00	00	00	00
	10^{-5}	17	00	00	00	00
		18	00	00	00	00

Sur tous nos tableaux, l'évolution de la fièvre aphteuse est ainsi désignée :

aphte primaire sur coussinet plantaire au point d'inoculation (gauche)	: +
aphte secondaire sur coussinet plantaire non inoculé (droit)	: . +
aphtes aux pattes antérieures	: . . A
aphtes buccaux	: . . . B
absence d'aphtes	: 0

La solution [illegible] filtrée est active à 10^{-4} et inactive à [illegible].

Après filtration [illegible] le virus perd toute activité [illegible] à 10^{-3} [illegible] moins actif puisque le virus est actif [illegible] une adsorption partielle de la [illegible]. [illegible], sur les indications du Professeur [illegible] la filtration sur disque [illegible] le filtre [illegible] passage de 10 à 20 cc. [illegible] en éliminant les dix premiers cc. du filtrat, très peu riches en virus. Le pH [illegible] varie au cours des filtrations ; par exemple [illegible] de virus O Lindholm sont dilués [illegible] cc. de liquide de J. André Thomas à pH 7,6, la dilution de virus non filtrée a un pH de 7,58 ; les dix premiers cc. de filtrat [illegible] sont [illegible]. Le reste du filtrat (pH 7,[illegible]) est actif [illegible] l'expérience [illegible], le pH de la suspension [illegible] après filtration et [illegible] L'activité d'un filtrat d'une suspension de virus [illegible] dans de bonnes conditions, [illegible] initiale.

TABLEAU N°2

		[illegible]	[illegible] h	[illegible] h	[illegible] h	[illegible] h
[illegible]	10^{-3}	1 [illegible]	+0	++	++A	++AB
		2 [illegible]	+0	++0B	++0B	++AB
	10^{-4}	[illegible]	+0	+0	++0B	++A[illegible]
		[illegible]	[illegible]	+0	++A	++AB
	10^{-5}	[illegible]	[illegible]	00	0[illegible]	0[illegible]
		[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	10^{-3}	[illegible]	[illegible]	+[illegible]	++A	++AB
		[illegible]	+[illegible]	+0	++AB	
	10^{-4}	[illegible]	+0	[illegible]	++AB	[illegible]
		[illegible]	+[illegible]	+[illegible]	+[illegible]	+[illegible]
	10^{-5}	[illegible]	[illegible]	00	00	[illegible]
		[illegible]	00	00	00	[illegible]

Les conditions de la filtration de grandes quantités de virus sont très importantes au point de vue de la préparation industrielle des vaccins ; elles ont été étudiées par [illegible] (1940). Les vaccins doivent être stériles, exempts de bactéries pathogènes comme [illegible] [illegible] [illegible] Les filtres de verre n'ont presque pas de pouvoir adsorbant, mais ne peuvent être retenus en raison de leur faible débit ; les filtres d'amiante doivent être utilisés ; les pertes peuvent être réduites au minimum, en effet, l'adsorption est réversible et l'élution peut être faite avec une solution tampon, à pH 7,6[illegible], de phosphates monopotassique PO_4H_2K (0,1 gr. pour 1.000 cc. H_2O) et disodique PO_4HNa_2 (0,91 gr. pour 1.000 cc. H_2O).

Le virus dilué est filtré 2 fois en eau distillée (12 fois le poids initial du matériel infectieux -suspension primitive et lavage-) et 2 fois en solution tampon d'une quantité un peu supérieure (15 fois le poids initial). Le passage du virus peut être contrôlé par le dosage des protéines à l'électrophotomètre. Les quantités de protéines (pour 1.000 de protéines sèches) di- [illegible] tion, à 1.270 à la fin de la 2ème filtration. Le lavage, à la solution tampon, élue une quantité appréciable de virus, puisque le taux de protéines tombe de 0,199 à 0,07 à la fin des 2 filtrations au tampon.

Ultrafiltration

En 1926, LEVADITI, NICOLAU & GALLOWAY démontrent l'ultrafiltrabilité du virus aphteux à travers les membranes [illegible] sent une suspension de virus cobaye sur des sacs à trois [illegible] neuf essais. L'ultrafiltration est sous la dépendance de plusieurs facteurs : composition de la membrane, pH, charge électrique.... Ils calculent la dimension du virus aphteux : 10 à 20 mμ. Au laboratoire de BORREL, OLITSKY & BOEZ (1927), par l'emploi de membranes de Bechhold (solution de collodion dans l'acide acétique à 1 p. 100) confirment les résultats précédents. Ils estiment entre 20 et 100 mμ la dimension des unités virulentes du virus, par comparaison avec l'ultrafiltrabilité des particules de collargol et de trisulfure d'arsenic colloïdal de tailles connues.

[illegible] les virus sur les membranes de [illegible] différentes, [illegible] virus aphteux [illegible] virus de [illegible] membranes [illegible] p. 100 [illegible] traversent les membranes à 2,5 p. 100. Cette dimension inférieure [illegible] n'est pas confirmée par GALLOWAY & ELFORD (1931) par [illegible] sur les membranes d'Elford, celles-ci ont des [illegible] [illegible] L'activité pathogène des souches aphteuses est de 5 [illegible] elle diminue, progressivement, par passages sur membranes de [illegible] [illegible], elle disparaît à 25 [illegible]

GALLOWAY & ELFORD [illegible] le diamètre du corpuscule [illegible] à 12 [illegible] La taille est identique quel que soit le type de virus, [illegible] Les variations de pH, allant de 5,4 à 8,7, n'influencent pas [illegible] filtrabilité du virus mais, en revanche, pour 30 [illegible] à pH 5 [illegible] traverse les membranes de collodion à [illegible] 100, on ne peut plus [illegible]

[illegible] (1936) trouvent [illegible] 10 mμ soit, après [illegible] 5 mμ [illegible] inoculation du filtrat [illegible] voque des aphtes [illegible]

[illegible] jettent [illegible]

GALLOWAY & [illegible] confirment [illegible]

[illegible]

La centrifugation à la vitesse de 2.000 à 3.000 [illegible] est nécessaire pour obtenir une suspension limpide de [illegible] virus, débarrassée des grosses particules étrangères : débris [illegible]

Même pendant 2 heures à 2.000-3.000 tours-minute (OLITZKY & [illegible] (BEDSON & MAITLAND, 1925), les corpuscules ne sédimentent [illegible] même activité se retrouve dans les couches supérieures et [illegible] res de la lymphe aphteuse centrifugée, pure ou diluée (GINS, 1924, STOCKMANN & MINETT, 1925).

[illegible] des tissus qui surnagent : le virus [illegible] petit et sa densité étant de 1,3 il ne peut [illegible] bénéficier de cette méthode.

PARRAT conseille une centrifugation [illegible] de 10 cc. poussée à 8.000 tours pendant [illegible] minutes pour obtenir un liquide surnageant virulent [illegible] stérile à l'ensemencement sur milieux bactériologiques. [illegible] 5.000 tours [illegible] PARRAT retrouve une centaine de microbes par cc. de suspension à la fin de l'opération. Il préfère la centrifugation à la filtration qui appauvrit la suspension [illegible] [illegible]

Pour certaines de nos expériences, faites sous la direction du Professeur [illegible], nous avons [illegible] des suspensions virulentes bactériologiquement stériles grâce à 2 centrifugations [illegible] tours-minute, séparées par [illegible] de la centrifugation et décantage de la partie supérieure du liquide surnageant dans de nouveaux tubes à centrifuger. Ceux-ci ainsi que les godets, sont refroidis à -20° avant la centrifugation, pour éviter l'altération du virus. [illegible] le couvercle de la centrifugeuse reste à demi-ouvert afin qu'il [illegible] contrôle : les ensemencements sur trois [illegible] [illegible] suspension de virus [illegible] à la silice d'aphtes bovins (N° 952) au 1/100 en liquide [illegible] [illegible] colonies par cc. [illegible] il n'apparaît aucune colonie après l'ensemencement postérieur à la centrifugation.

Ultracentrifugation

[illegible] la sédimentation des [illegible] il faut utiliser les ultracentrifugeuses. Il existe plusieurs types d'appareils, plus ou moins compliqués, et d'un emploi difficile et coûteux ; certains réalisent des vitesses de 100.000 à 600.000 tours-minute.

[illegible] la [illegible] corpuscules [illegible]

[illegible] partie périphérique d'un [illegible] gel de gélose pour retenir les [illegible] l'effet de la centrifugation. [illegible] BOGER assigne [illegible] pensent que ce [illegible] sédimentation, après une rotation [illegible] tours-minute [illegible] suspension de virus [illegible] de phosphates, et ils concluent que les particules du virus [illegible] être plus [illegible] que [illegible]

ELFORD & GALLOWAY ([illegible]37) emploient la technique du "[illegible] capillaire renversé" d'ELFORD, centrifugé 2 h. à 11,000 tours-minute, soit une force correspondant à [illegible].000 fois celle de la pesanteur, [illegible]

Des tubes capillaires sont remplis de la suspension virulente [illegible] fermés seulement à leur extrémité supérieure. Ils sont [illegible] des tubes à centrifuger contenant la même suspension [illegible] les capillaires n'atteignent pas le fond [illegible] pour [illegible] concentrées ; le [illegible] et l'épaule [illegible]

[illegible] cette technique, ELFORD & GALLOWAY ont la preuve [illegible] expérience, le [illegible] s'abaisse, après centrifugation, à 10-1. Le virus [illegible] récupéré complètement du papier [illegible] L'évolution de [illegible] virus e[illegible] 20 mμ la dimension [illegible] acquise par l'ult[illegible] du virus de la fièvre aphteuse [illegible] Les particules devraient [illegible] par comparaison avec les [illegible] Ils trouvent que la dimension des particules est la même pour les trois types, [illegible]

Une autre technique [illegible] GALLOWAY (1937). Elle [illegible] utiliser la supercentrifugeuse Sharples avec un "cylindre [illegible]" celui-ci a 20 cm. de long et [illegible] cm. de diamètre, avec [illegible] interchangeable. Les corpuscules n'ont qu'une petite distance à parcourir, pendant la rotation, pour être saisis par une gar[illegible] les parois du cylindre. La virulence d'[illegible] peut être réduite de 90 à [illegible] centrifugation [illegible] 31.000 tours-minute. Le virus [illegible] sans perte en broyant la gélose dans un liquide [illegible]

par ultrafiltration ne s'adsorbe pas sur la gélose en raison des impuretés (protéines).

L'évaluation du taux de sédimentation est basée sur le titrage des liquides surnageant après différents temps de centrifugation, ce qui permet de déterminer la vitesse de sédimentation. Les suspensions de virus sont titrées, chez le cobaye, par inoculations en série de dilutions progressivement croissantes.

Les résultats donnés par 15 expériences confirment les précédents : le taux de sédimentation est le même pour les trois types de virus, O, A, C. Le diamètre moyen des particules est de 20 mμ.

[illegible] équilibre de sédimentation du virus est réalisé lorsque la sédimentation, dans le liquide surnageant, ne peut être dépassée par une centrifugation prolongée. Cet équilibre peut servir de base au calcul du poids d'une particule de virus : SCHLESINGER & GALLOWAY ont déterminé [illegible]
[illegible]
par la vitesse et l'équilibre de sédimentation [illegible]
à la forme des corpuscules aphteux.

Nous avons vu que l'ultracentrifugation combinée à l'ultrafiltration a permis à GALLOWAY & SCHLESINGER (1937) de purifier et de concentrer le virus aphteux.

JANSSEN (1941), à Upsala, ultracentrifuge des préparations de virus purifié (lymphe aphteuse de type O de porc, défibrinée, filtrée, réfrigérée). Après 10 h. à [illegible].000 tours-minute dans la cellule de Svedberg (ce qui représente un champ de centrifugation égal à [illegible].000 fois la pesanteur de la terre), la partie supérieure de la suspension centrifugée ne contient plus de virus. La constante de sédimentation est de [illegible]. Le virus peut être purifié en émulsionnant le culot [illegible] vea[illegible] : la constante de sédimentation [illegible]

Avec la centrifugeuse [illegible] en [illegible] h.30 à 25.000 tours-minute (40.000 fois la pesanteur de la terre), JANSSEN recueille un dépôt visqueux d'albumine jaune (soluble, en partie, dans une solution tampon). Avec ce [illegible]
[illegible]=18.10^{-13}.

L'ultracentrifugation de la lymphe aphteuse de cobaye a permis à [illegible] d'obtenir [illegible] un composant possédant tout le pouvoir infectant et un autre tout le pouvoir de fixation du complément.

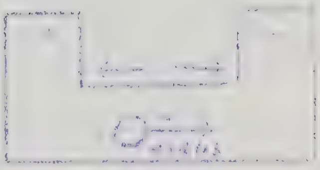
Charge électrique :

Electrophorèse. Point isoélectrique :

L'électrophorèse, appliquée à la [illegible] différenciation de virus [illegible] virulence de quelques virus ; suivant le pH [illegible] dans un champ électrique, les corpuscules se déplacent vers l'anode ou la cathode. La charge électrique du virus aphteux peut être ainsi déterminée, de même que le point isoélectrique : celui-ci correspond à la valeur du pH pour laquelle les corpuscules ont une charge libre nulle, autrement dit qu'ils ne se déplacent pas dans un champ électrique alors que, de part et d'autre de ce point le virus se déplace vers l'une ou l'autre électrode.

Les travaux sont contradictoires ; pour OLITSKY & BOEZ ([illegible]), le point isoélectrique serait aux environs de pH 8 et le virus aurait une charge positive de pH 6,6 à 8, et une charge négative de pH 8 à 11. C'est pourquoi les filtres Chamberland L₂ chargés négativement adsorbent le virus à pH 7,6 et non s'il est en milieu alcalin. Les membranes de collodion électro-négatives très minces et très perméables ne peuvent servir en raison de leur fragilité. POPPE, [illegible] puis [illegible] se rangent à l'avis d'OLITSKY & BOEZ. Ces résultats ne sont pas confirmés et, pour la plupart des auteurs, le virus est chargé négativement comme les autres virus. [illegible] ([illegible]) trouve une charge négative de pH 6,[illegible] à [illegible],6. [illegible] ([illegible]) ne peut mettre en évidence l'existence d'un point isoélectrique, le virus possède une charge négative, quel que soit le milieu employé de pH 7 à 8,2. A pH 7,6, le virus va vers l'anode et non vers la cathode [illegible] (1931), résultats confirmés par KOBE & FAHL (1936) : à la fin de l'électrophorèse ils trouvent, à l'anode, de 1/32 à 1/400 de la quantité totale du virus, cette partie est virulente, [illegible] pour les différents types. Il n'est pas possible de savoir si le signe de la charge est [illegible] du virus. D'après KOBE & FAHL, le dispositif expérimental des auteurs ayant observé des transports à [illegible] était défectueux. [illegible] lymphe [illegible], au niveau de la cathode, une substance qui [illegible] le pouvoir infectant de la fraction [illegible] négative [illegible] de l'anode, [illegible] de 2 à 16 fois l'infectuosité d'une lymphe aphteuse de même type. Cette substance [illegible] spécificité, elle serait détruite par la chaleur ; elle se retrouve dans le sang des animaux immunisés (P.). KOBE, par des expériences d'électrophorèse pense que le virus aphteux [illegible] parties : l'une à charge électrique négative possède le rôle pathogène (elle serait adsorbée par l'hydroxyde d'aluminium chargé positivement), elle est commune aux trois types ; l'autre partie, à charge électrique positive, exalte le pouvoir pathogène : elle est spécifique [illegible]

comme antigène et provoque [illegible]

Anode  Cathode

pH :

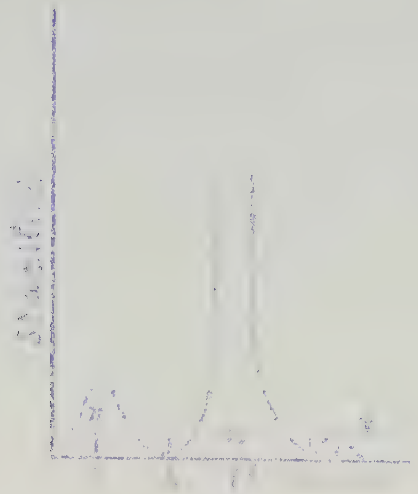
La stabilité du virus aphteux [illegible] fonction de la concentration des ions hydrogène du milieu où il se trouve. En dehors de l'organisme l'optimum est situé à pH 7,6 (BEDSON & MAITLAND, 1925, STOCKMANN & MINETT, 1926, SCHOENING, 1927, [illegible] 1929, PYL & KLENK, 1933). Le virus conserve, dans certaines conditions, son activité s'il est placé à des pH s'étendant entre 6 et 13,2. A pH 6,2, à + 4°, il ne survit, en tampon phosphate, que 69 heures (BEDSON & MAITLAND). Pour GIBBS (1931), le virus survit 11 jours à pH 6,9, et moins de 30 minutes à pH 6, plus de 24 heures à pH 9,4, mais moins de 30 minutes à pH 13,2. Dans une solution aqueuse à pH 8, le virus s'atténue en 4 heures ([illegible], 1946).

PYL & KLENK (1933) trouvent les limites de stabilité pH 6,5 - 8,5 trop étroites ; au-dessus de pH 11 le virus est tué et en milieu acide la stabilité est différente [illegible] acide, le virus perd rapidement [illegible] virulence, alors qu'en dilution [illegible] pH 2 à 3 il [illegible]serve assez longtemps son activité. Aux environs de pH 6 (entre pH 5,7 et 6,5), selon les lymphes, le virus est inactivé en quelques minutes.

La résistance du virus à [illegible]° est augmentée dans un milieu fortement acide ou faiblement alcalin.

Le virus purifié de GALLOWAY & ELFORD (1936) se comporte comme le virus non purifié. Il est relativement stable de chaque côté d'une zone dans laquelle le virus est rapidement inactivé : pH [illegible],6 à 7,6. Selon PYL (1936) le virus existerait sous 2 formes stables : sa forme naturelle N à pH 7,6 et une forme spéciale X à

[illegible] pH [illegible] 7,7 [illegible]



[illegible]

[illegible] à l'étude de la survie du virus aphteux, [illegible] stabilité du pH [illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible] avec [illegible]

[illegible]

[illegible] traces [illegible]

- Vache abattue depuis 2 heures - La muqueuse est très résistante, adhérente aux muscles sous-jacents, difficile à prélever et à broyer. 7,6 gr. de muqueuse sont broyés au sable et dilués en eau bidistillée (pH 7,12 ; eau bidistillée + sable centrifugé pH 7,52), après une centrifugation de 15 minutes à 6.000 tours le pH est de 7,32 ; après un séjour de 24 h. à + 4°, pH = 7,38. La même muqueuse conservée 24 h. à +4° et préparée par la même technique a un pH de [illegible],72.

pH de muqueuse de langue modifiée <u>in vivo</u> :

MOOSBRUGGER à Bâle et GIRARD à Lyon ont recherché le pH de broyages de muqueuses de langues aphteuses en eau distillée, après une conservation de 24 h. ils trouvent des pH de 7,6 à 8,4

Les broyages d'aphtes bovins servant à inoculer nos cultures sont légèrement alcalins : entre pH 7 et 7,9 (exp. 14, 21), même après 5[illegible] jours de conservation (exp. 15, pH 7,95)

Nous avons recherché, sur les instructions du Professeur J.-André THOMAS, le pH de muqueuse de langue altérée par injection intradermique d'essence de térébenthine (0,5 cc. en 3 piqûres). 22 h. après on prélève 1 cc. de muqueuse blanchâtre au niveau de 3 petites zones de décollement ; après broyage à sec, dilution dans 20 cc. d'eau bidistillée (pH 7,12), [illegible] pH = 7,16.

Dans les mêmes conditions 0,5 [illegible] teinture de cantharide pure provoque le décollement de la muqueuse linguale, dont le pH [illegible] pH 7,[illegible], teinture de cantharide pH 5,[illegible].

pH de peau de foetus

- foetus non inoculés - La peau de nombreux foetus a un pH à tendance acide [illegible] à 7 et d'autant plus que le temps de conservation est long, par exemple la peau d'un foetus de vache, de 25 cm., conservé 30 h. dans l'utérus fermé, à 38°, donne un pH de 6,3. Les mesures sont faites sur 5 gr. de peau broyée au sable et diluée au 1/5 ou au 1/10 en divers liquides physiologiques à pH neutre.

- foetus perfusés en milieux divers de pH 7,5 à 8 et inoculés de virus aphteux - Le broyage de la peau au 1/10 en eau physiologique tamponnée (pH 7,6) a un pH de 7,32 (exp. 10, 25, 28, [illegible]). Après une conservation de 150 jours dans un même liquide, la peau d'un foetus, après perfusion et culture du virus aphteux (exp. 13) a un pH de 7,26, la muqueuse de la langue un pH de 7,48 ; la peau

[illegible] un foetus [illegible] non perfusé (exp. 1[illegible] bis) a un pH de 7,[illegible], et la langue 7,[illegible].

La peau de [illegible] et de la tête, après injections multiples de virus aphteux par piqûres, incubation de 30 h.[illegible], puis dilution au 1/[illegible] et [illegible] de [illegible] André [illegible], a un pH de [illegible] après [illegible] jours de conservation [illegible] ; la peau de la cuisse [illegible] par quelques injections intradermiques [illegible] les mêmes conditions, un pH de [illegible] (exp. 15). La peau de foetus de l'expérience [illegible] a un pH de [illegible] après [illegible] jours de conservation.

Les liquides [illegible] tenant en suspension des fragments [illegible] jus exsudés des peaux, ou milieu glycériné tamponné, sont [illegible] après une vingtaine de jours de conservation, pH 6,[illegible] (exp. [illegible]), [illegible] (exp. 15), 6,65 (exp. 16), 6,52 (exp. 19). Toutefois, le milieu de conservation classique, glycériné et tamponné aux phosphates, s'acidifie de lui-même, le pH 7,5 tombe, en 24 jours, à [illegible].

En résumé, d'après nos mesures de pH, à l'électrode de verre, la muqueuse de vache normale ou aphteuse a un pH légèrement alcalin, aux environs de 7,3 (muqueuse normale), 7,5 (muqueuse aphteuse).

La peau de foetus a un pH acide voisin de 6,5 ; après culture du virus aphteux au cours de perfusion foetale (par liquide glycériné), le pH de la peau est alcalin, 7 à 8 ; il conserve cette alcalinité après une conservation de plusieurs mois à la glacière.

Adsorption

L'adsorption est une propriété [illegible] [illegible]

VALLEE [illegible]
les virus filtrants [illegible]
cules de tr[illegible]
quides [illegible]
de la maladie [illegible]
[illegible]
de [illegible]. L'adsorption [illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]

[illegible]

[illegible] FROSCH & DAHLEN (1924), [illegible] & [illegible] (1925), [illegible] (1926) n'ont pas réussi à fixer le virus aphteux sur des globules rouges de veau, de [illegible] et de cobaye, ou sur des protéines de sérum [illegible] [illegible] [illegible] a été toutes fois confirmée depuis et observée, au microscope électronique, pour de nombreux virus.

Le virus aphteux est adsorbé par des particules inanimées. ADE (1925) adsorbe le virus aphteux sur kaolin et charbon animal, bien que [illegible] (1925), FROSCH & DAHLEN (1924) n'y soient pas parvenus.

Le charbon animal adsorbe bien le virus, [illegible]. Le virus n'est pas altéré par l'adsorption, [illegible] être libéré par un changement [illegible] d'aluminium adsorbe le virus [illegible] 6 (PYL, 1931). [illegible] au pH explique les contradictions des [illegible] teurs précédents. Les expériences de [illegible] (1940) ont prouvé que le virus en suspension [illegible] eau physiologique à pH 7,6 est entièrement adsorbé par le carbone animal [illegible] charbon d'os ordinaire ou purifié (10 gr. pour 10 [illegible] de liquide virulent), et le gel phosphocalcique (solutions glucocalcique et phosphate [illegible]). Le phosphate tricalcique [illegible] le même [illegible] végétal (charbon de bois pur ou de noix de coco). [illegible] CORDIER (1940) adsorbe, simultanément, le virus aphteux et le virus claveleux sur le carbone animal. [illegible], MAITLAND & BURBURY (1927) adsorbent le virus sur une suspension [illegible] de cobaye avec du sulfate d'ammonium ; ce virus est libéré par la dissolution de la globuline dans un volume [illegible].

[illegible] le virus n'est [illegible] la présence de [illegible] protéines protec[illegible] membranes de [illegible].

[illegible] virus aphteux a diverses applications

[illegible] sorption, PYL (1931) [illegible] dans une dilution trop [illegible] ne provoquait pas [illegible] résultat avec l'urine, [illegible] (sauf [illegible]) est adsorbé [illegible].

Purification : [illegible] (1950) purifie le virus aphteux par adsorption à un certain pH et élution à un autre pH. Cette technique peut détruire une certaine partie du virus, il préfère former l'adsorbant dans la solution contenant le virus ; il sépare ensuite le virus par élution ou dissolution de l'adsorbant. Une solution [illegible] de sulfate de calcium contenant du virus aphteux précipitée par l'alcool ou l'alcool-éther (7 et 3 parties) à basse température, le virus aphteux est entraîné avec le fin précipité de gypse. Ce dernier, isolé par centrifugation, dissous dans l'eau, [illegible] par [illegible] saturé libère le virus aphteux très pur.

La purification de SCHLESINGER & GALLOWAY, par ultracentrifugation, est limitée par la présence de protéines gênant l'adsorption sur la gélose.

Diagnostic : [illegible] (1951) obtient une agglutination des particules [illegible] sur lesquelles le virus aphteux est [illegible]

[illegible]

Immunité : [illegible]
[illegible] du virus aphteux par l'[illegible] [illegible] immunisantes [illegible] SCHMIDT [illegible]

[illegible] a reconnu le pouvoir [illegible] ses "complexes" virus-charbon, virus-phosphate tricalcique, [illegible] immunité. Chez le [illegible] suivie, [illegible] du même "complexe" [illegible], mais confère une [illegible] par le "complexe" virus-aphteux [illegible] le Bovin est réf[illegible] Le "complexe" : virus-gel phosphoc[illegible] une solu[illegible] "complexe" [illegible] animal et une valeur supérieure au "complexe" virus-[illegible]

b) Action des agents physiques :

[illegible] :

Chaleur :

Le virus [illegible] très sensible à une élévation de température, d'autant plus s'il est extrait des cellules et mis en suspension.

A 50°, la lymphe reste virulente 6 jours. La lymphe non diluée des vésicules perd toute son activité à 37° en 12 à 24 heures, à 50° en 15 minutes, à 70° en 10 minutes, et à 100° instantanément (LOEFFLER, FROSCH & UHLENHUTH, 1898). En tubes fermés, à 48°, la lymphe est active au moins 6 heures (FROSCH & DAHLEN, 1924). Entre [illegible] et [illegible], la rapidité de destruction augmente de [illegible],7 fois à chaque élévation de température de 1°. Pour [illegible] ([illegible]) [illegible] diluée en solution saline à pH 7,4, résiste 3 à 4 jours à 37°, de 15 à 40 minutes à 55° ; le sang défibriné reste virulent, à 55°, pendant 15 minutes mais devient inactif en 20 minutes. A 37°, le virus dans le sang de cobaye survit 24 heures, mais non 48 heures. Pour BROCKSBY, le sang virulent, d'origine bovine s'inactive plus lentement à 37°, ci-[illegible] seraient responsables. Plus le titre initial d'un sang infectant est élevé plus le temps de survie d'un virus est élevé. L'élimination des hématies écourte le temps de survie du virus. Le lait perd son pouvoir pathogène en 30 minutes, à la température de la pasteurisation basse : 63 à 65° et immédiatement à plus de 100° (VERGE, 1943). Les variations rapides de température (chaleur et froid successifs) détruisent rapidement le virus aphteux.

Froid

Au contraire, le froid conserve l'activité du virus aphteux. La lymphe, en tubes capillaires, à l'obscurité, à +4°, est active au moins 12 jours après sa récolte et jusqu'à 3 à 4 mois (LOEFFLER, FROSCH & UHLENHUTH, 1898).

Le virus [illegible] considé[illegible] & CARRE (1902) [illegible] inférieures à [illegible] à 2 mois, et le sang défibriné virulent en ampoules scellées ou en flacons bouchés au caoutchouc, entre -1° et -2°, pendant 2 à 6 mois.

BEDSON, MAITLAND & BURBURY (1927) conservant 453 jours de la lymphe à la glacière, et MENCU, 425 jours. STOCKMANN & MINETT (1926) ont conservé de la lymphe de cobayes [illegible]es de coussinets plantaires pendant 180 jours entre 4 et 7°, leur ayant même fait subir 20 congélations et décongélations successives ([illegible]).

[illegible] :

A [illegible], la conservation du virus aphteux paraît très [illegible] la lymphe [illegible] reste active des semaines ([illegible] [illegible]) [illegible]. Nous conservons, [illegible], nos [illegible] au Laboratoire de Recherches Vétérinaires, en [illegible] à [illegible] [illegible] [illegible] l'activité de nos souches (origine : Bovin ou Cobaye) est in[illegible] depuis plus de [illegible] que nous les gardons ainsi.

Les températures très basses ([illegible]) n'ont pas d'action sur [illegible] virus aphteux. [illegible] plonge des lambeaux d'aphtes, [illegible] 15 minutes, dans l'air liquide, sans atténuer leur pouvoir pathogène.

Nous avons fait l'expérience suivante :

L'épithélium d'un aphte primaire est prélevé sur le coussinet plantai[illegible] d'un cobaye [illegible] de virus aphteux (type [illegible]) depuis 24 heures. Le lambeau [illegible] est coupé finement aux ciseaux, [illegible] au sable, dilué [illegible] en liquide [illegible] à pH 7,[illegible]. La suspension, après [illegible], est divisée en deux parties égales : l'une [illegible] de témoin et est conservée à +2° pendant [illegible] heures, l'autre est [illegible], pendant le même temps, sans interruption, dans l'air liquide (-195°7). Pour le titrage, 1/4 cc. de chaque solution est inoculé, par voie intradermique, dans le coussinet plantaire [illegible] de 3 cobayes :

TABLEAU N°3

	Cobayes	24 h.	48 h.	72 h.	[illegible] h.
Suspension témoin	31 [illegible] [illegible]	+0 [illegible] [illegible]	++A ++ [illegible]	++A ++A ++A	[illegible] [illegible] [illegible]
Suspension soumise à -195°7	34 35 36	00 +0 00	+0 +0 +0B	+00B ++0B ++AB	++0B ++0B ++AB

[illegible]

[illegible]

Dessiccation

Bien que les premiers essais de dessiccation de lymphe virulente, par LOEFFLER & FROSCH (1898), aient détruit sa virulence [illegible] à 22°, à la lumière, il est maintenant reconnu que le virus desséché rapidement conserve longtemps ses propriétés, il est moins sensible à la chaleur et aux variations de température. La survie du virus aphteux desséché dépend de différents facteurs : milieu où se trouve le virus, température, humidité de l'atmosphère et support sur lequel le virus est desséché.

ROUX, NOCARD, VALLEE & CARRE (1902) ont constaté la persistance [illegible], pendant 7 à [illegible] jours, de lymphe desséchée rapidement sur lames de verre, dans le vide, et conservée à la température du laboratoire ; [illegible] virulent se conserve de 20 à 105 jours. L'incubation de la maladie est toutefois plus longue qu'avec un virus frais. La Commission anglaise a étudié dans le détail la conservation du virus desséché : le virus peut rester virulent 2 ans s'il est desséché dans le vide, sur du verre, en présence d'acide phosphorique ; il ne résiste que 5 mois s'il est desséché à la température du laboratoire, ou en atmosphère humide. BEDSON, MAITLAND, BURBURY (1927) ont étudié le rôle des supports sur la survie du virus : papier filtre ([illegible] jours), [illegible], laine (14 jours), [illegible], foin ([illegible] à 15 semaines), son (8 à 20 semaines), farine (2 à 7 semaines), [illegible] des allées d'un jardin (15 jours), cuir des chaussures (102 jours). La cause des différences de survie, selon les supports, n'est pas [illegible] agents plus ou moins [illegible].

[illegible] du sérum et du sang desséchés [illegible]. Le lait contaminé desséché reste virulent 10 secondes à 100° et 5 minutes à 70° (GALLOWAY, 1931). Le virus aphteux purifié par ultrafiltration et desséché en présence de [illegible] reste actif pendant 8 jours (GALLOWAY & ELFORD, 193[illegible]).

La lymphe en couche desséchée possède une résistance [illegible] : 2 h.30 à 70°, 7 minutes à [illegible] ([illegible], 1926).

Lyophilisation

[illegible] le virus [illegible] excellentes méthodes [illegible] (méthode de FLOSDORF-MUDD) [illegible] résultats : l'émulsion

[illegible]

C'est actuellement le meilleur test de conservation du virus [illegible]

[illegible] :

Le pouvoir infectant du virus [illegible] malgré l'exposition de 5 minutes aux [illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible] se [illegible] avait [illegible] minutes par des radiations de [illegible] longueur d'onde, mais s'il n'est pas filtré [illegible] ou en sérum, il résiste 30 minutes [illegible], 1928).

SCHMIDT, HANSEN & [illegible] (1948-1949) ont, les premiers, cherché à atténuer le virus aphteux suffisamment pour le transformer en vaccin immunisant. Le temps d'irradiation doit être assez court pour ne pas tuer le virus et assez long pour le rendre avirulent : un virus A Vallée de passage sur cobaye, dilué à 10^{-7} perd ses propriétés pathogènes en 65 secondes, mais son pouvoir [illegible] après 540 secondes d'[illegible] [illegible] virus (1,4 p. 100, [illegible] à 10^{-7} sur bovins et [illegible] (94 p. 100), [illegible] dans [illegible] virulent après 45 secondes [illegible] 160 secondes, le virus [illegible] vaccine les cobayes et les [illegible] de 300 à 550 secondes donne de [illegible] résultats. Le virus en sérum s'irradie [illegible]

[illegible]

virus aphteux [illegible] pure, [illegible] raison chimique résiste [illegible] aux influences [illegible] et chimiques et [illegible] la protamine, [illegible] pité ([illegible] ent du virus aphteux [illegible] ([illegible]1), par irradiation aux U.V. transforment [illegible] vaccin : 2 cc. par voie sous-cutanée [illegible] munité est [illegible] frales, de [illegible] d'aluminium.

[illegible] sur le virus, adsor[illegible] non sur hydrox[illegible] reprise, pour appliquer les [illegible] laboratoire à l'industrie par GIRARD, MACKO[illegible] (1951), [illegible] (1951) et [illegible] (1951). Ces auteurs confirment l'action des U.V. ; l'appareillage joue un rôle néfaste par sa production d'ozone et de chaleur. GIRARD et ses collaborateurs, pour y remédier, emploient des filtres (solution de chlorure de sodium à 10^{-3}) et, par une irradiation de 30 secondes, dans ces conditions, inactivent une suspension de virus, type O, à 10^{-2}.

D'après [illegible], le type C perdrait plus facilement son pouvoir immunisant que les types O et A.

[illegible] radon : Ils inactivent le virus [illegible] teuse. La taille du virus [illegible] l'action des rayonnements :

[illegible] ([illegible]), [illegible] [illegible] trent des [illegible] du virus avant et après rayonnement, [illegible] en [illegible] le rayonnement absorbé et, par des méthodes [illegible] [illegible], à la souche dermotrope du virus aphteux ([illegible] [illegible] Vallée), par l'irradiation X, une dimension de 25 mμ et, [illegible] irradiation [illegible] [illegible] 10, dimension située entre celle [illegible] [illegible] d'*Helix pomatia* et celle du [illegible] [illegible] [illegible] de la souche [illegible] de [illegible] [illegible] (P,167), par les mêmes irradiations, donne des chiffres [illegible] [illegible] : 65 m [illegible] 10 (irradiation α).

Spectre d'absorption : Le virus aphteux, comme tout élément, [illegible] être caractérisable par un spectre d'absorption particulier individualisé par certaines [illegible] correspondant à des longueurs d'ondes déterminées. L'analyse spectrale est difficile pour [illegible] du virus [illegible] [illegible] celle de tous les ultravirus [illegible] [illegible] de pureté [illegible] [illegible] d'absorption due à des protéines [illegible] peu caractéristiques. [illegible] (1941), a [illegible] réussi [illegible] le virus [illegible] [illegible] l'ultracentrifugeuse de Svedberg ([illegible] [illegible] [illegible]) et l'ultracentrifugeuse de Beams ([illegible] minute) ; le spectre du virus ainsi obtenu, en lumière ultraviolette, est le spectre typique des protéines avec maximum et [illegible] comme la sérum-protéine, mais l'absorption maximum de la virus-protéine est déplacée vers les longueurs d'onde plus courtes [illegible]

Ultrasons :

Les ultrasons désintègrent les cellules, les microbes et peuvent cliver certaines molécules protidiques. Leurs effets sur les virus, plus ou moins purifiés, sont contradictoires.

Sur le virus aphteux, les ultrasons [illegible] paraissent pas avoir d'action. Pendant des durées de 30 [illegible] à [illegible] heures, [illegible] [illegible] [illegible], les ultrasons [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] en déposant la suspension [illegible] dont le fond est fermé par une [illegible], [illegible] est placée au point de convergence [illegible]. [illegible] de saumure dans la double [illegible] [illegible] [illegible].

[illegible]

Nous avons eu à notre disposition un appareil à ultrasons [illegible] (1) [illegible] d'un générateur de haute fréquence

---

(1) Nous [illegible] [illegible] JEANSON, [illegible] [illegible] [illegible] mis si aimablement [illegible] cet appareil à ultrasons [illegible] plus reconnaissants [illegible] et M. BRICKA [illegible] leurs conseils.

[illegible] de 1[illegible], le quartz [illegible]électrique [illegible] fréquence [illegible] kilocycles.

Nous avons utilisé [illegible] matériel infectant, dans une première expérience, des lambeaux [illegible] d'épithélium d'aphtes primaires de [illegible] de virus aphteux, type O, depuis 24 heures [illegible] deux expériences suivantes, le broyat d'épith[illegible] recueilli dans les mêmes conditions ; lambeaux et broyats sont [illegible]pendus dans une solution tamponnée à pH 7,6 par les phosphates mono- et disodique. Pour chaque expérience, [illegible] à la température de 10 - 15°.

La suspension virulente est placée dans un tube de [illegible] dont la partie inférieure est fermée par une feuille [illegible] cellophane. Le tube est placé au centre de la cuve [illegible] l'appareil, juste au-dessus du vibrateur piézo-électrique, afin d'obtenir [illegible] de l'énergie vibratoire [illegible] la position où les vibrations sont les plus [illegible], là où le liquide est agité avec le plus de f[illegible] liquide semble bouillir. La cuve est remplie d'eau [illegible] additions successives de morceaux de glace. La t[illegible] du liquide virulent soumis aux ultrasons est vérifi[illegible] un thermomètre, elle n'a jamais dépassé 10 à 15°.

Les solutions traitées et témoins sont titrées sur cobayes : 1/4 cc. de suspension par voie intradermique (coussinet plantaire gauche) ; 2 cobayes pour cas [illegible]antillon.

[illegible]

Les [illegible] et pl[illegible]

Au cours de [illegible] de 1 h., 3 h., 6 h. [illegible] h., [illegible] h., [illegible] broyage [illegible] dilution au 1/1[illegible] tamponnée. Au bout de 1[illegible] heures, les [illegible] pithéliu[illegible] ne sont plus [illegible] témoins non plus ; le temps [illegible] tion est dépassé, dans nos condition[illegible] [illegible] température et des [illegible]

[illegible] expérience :

Il est [illegible] que la trame des cellu[illegible] virus aphteux dans le premier essai. Nous avons alors soumis aux ultrasons un broyat, à la silice, d'épithélium, dilué au 1/50 e[illegible]

[illegible] par [illegible] et vérifiée par [illegible]

La suspension est placée dans le [illegible] /18.500 [illegible] à la [illegible] et soumise aux ultrasons. Des prélèvements au bout de [illegible] [illegible] minutes [illegible] sont virulents [illegible] inoculations [illegible] dans la [illegible] témoin conservée [illegible] à la température du laboratoire.

TABLEAU N° [illegible]

		[illegible]	[illegible]	[illegible]
Virus n'ayant pas subi [illegible] ultrasons		[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible] mn	41 42	+0 +0	++A ++AR
	15 mn	43 44	+0 +0	++AR [illegible]
Virus passé aux ultra-sons	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Virus témoin		[illegible]	[illegible]	[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Nous avons constaté, au cours d'un traitement, la formation, en très faible quantité, d'un précipité blanc se collectant en traces d'écume à la surface du liquide en suspension. Nous avons également observé de telles précipitations au cours de congélation à -20° puis décongélation. La virulence du liquide est conservée, toutefois elle semble atténuée. Nous n'avons pas réussi à élucider ce fait, car il n'est pas constant et la quantité des précipités est trop petite.

4) [illegible] CHIMIQUE.

a) Constitution chimique.

La composition chimique des virus commence à être précisée depuis qu'il est possible de les purifier [illegible] quantité. Un centimètre cube de lymphe aphteuse active à 10^{-6} renfermerait 1 à 2 [illegible] à 10^{-8} ([illegible] 1935).

Les corpuscules des gros virus comme ceux de la vaccine sont constitués par des matières protéiques, principalement des nucléoprotéides combinés à de petites quantités de lipides et de glucides si intimement liées aux protéines qu'on ne peut les séparer sans inactiver le virus. Ils auraient peu d'activité enzymatique [illegible] oligo-éléments (Cu pour la vaccine), ne montreraient aucune activité respiratoire au contact de l'oxygène, ni aucune fermentation en anaérobiose [illegible] d'une vie [illegible]laire ab[illegible].

Les petits virus sont encore plus pauvres, ce sont des molécules de [illegible] plus ou moins pures puisqu'après purification la préparation ne contient que ce seul constituant. Nous ne rappellerons pas la constitution des nucléo-protéides, notons seulement que le virus aphteux contient, d'après JANSSEN (1938), un acide [illegible] est le ribose.

Les [illegible] jouent un rôle important [illegible] le pouvoir pathogène des virus.

Le corpuscule élémentaire aphteux ne contiendrait ni lipides ni glucides ni [illegible]. La lymphe aphteuse contient d'après JANSSEN (1941) une importante quantité de phosphore lipidique à côté de facteurs antigéniques. [illegible] (19[illegible]) trouvent, avec la lymphe aphteuse, une amylase, une lipase et une peptidase. [illegible] (1950) montre que ces diastases ne sont pas spécifiques [illegible] dans les vésicules de brûlures.

POIDS MOLÉCULAIRE

De l'équilibre de sédimentation (4.10^{-12} à 9.10^{-12}) SCHLESINGER & GALLOWAY (1937) estiment le poids d'un corpuscule autour de 1.10^{-17}. Le poids moléculaire, calculé en multipliant le poids du corpuscule par le Nombre d'Avogadro 6.10^{23} (nombre de molécules dans une molécule-gramme), est de 6.000.000. Le diamètre d'une sphère du poids de 1.10^{-17} gr., d'un poids spécifique de 1,30, correspond à 25 mμ (un poids spécifique de 1,40 correspond à 21 mμ). Ces chiffres concordent avec ceux de JANSSEN ([illegible]) qui trouvait un poids moléculaire de 4.10^{6} contenant environ 150 molécules d'acide nucléique ; mais JANSSEN (1941) obtient, par de nouvelles ultracentrifugations d'un virus purifié de lymphe de type O de porc, une constante de sédimentation S_{20} = 17 à [illegible] ce qui donne un poids moléculaire beaucoup plus faible 500.000 à 1.000.000 correspondant à des dimensions plus faibles. La nucléoprotéine purifiée est homogène. Les expériences de JANSSEN sont conduites, dans de très bonnes conditions, à [illegible] avec QUENSEL et [illegible], sous la direction de SVEDBERG et de FRENKEL, elles portent sur une protéine déjà très purifiée, ce qui explique les résultats différents de ceux de SCHLESINGER à [illegible] la virulence [illegible] précisée.

[illegible] retrouver les [illegible] ques dans [illegible] trouve un [illegible] du virus [illegible]

[illegible] (virus type A) sont plus stables que ceux des sérums [illegible] MANTOVANI (1950) constate une diminution d'un tiers de la quantité de lipides extractibles.

Nous avons exposé au chapitre de la purification du virus aphteux, les méthodes de précipitation employées par [illegible] ; ce sont celles de [illegible] des protéines par le [illegible]

[illegible] ...érine-alcool-éther à -10° [illegible], il obtient un précipité [illegible] et virulent ; dans une suspension de virus et de sulfate de calcium à saturation, l'addition d'alcool précipite le sulfate de calcium qui entraîne le virus [illegible] ; ce précipité peut être dissous par l'eau. La solution renferme le virus purifié et une certaine quantité de globulines. L'activité du virus est conservée.

De même nous avons vu que [illegible] & [illegible] ([illegible]) obtiennent un produit virulent, insoluble dans l'eau, [illegible] lange de virus, se séro-[illegible]

[illegible] cobayes, une [illegible] [illegible] par addition d'acide [illegible] Le précipité se [illegible] dans une solution [illegible] de. La protéine contient [illegible] p. 100 d'azote [illegible] n'a plus d'activité pathogène, ce qui [illegible]

[illegible] chimiques.

[illegible]

[illegible] pendant [illegible] jours [illegible]

Les solut[illegible] chlorure de sodium [illegible] les suspensions du virus [illegible] Ringer, Locke, Tyrode, [illegible] conseiller ; nous [illegible] pour les cultures du virus [illegible] recommandé mais il n'est [illegible] avons eu des cultures [illegible] perfusé en milieu [illegible] ClNa + 40 p. 1.000 de [illegible] [illegible]n est d'une importance [illegible] [illegible] sont obtenus avec [illegible]

[illegible] ...stes ne sont pas toxiques [illegible] solution saturée de ClNa [illegible]

[illegible] tamponné additi[illegible]

[illegible] Cobaye survivent trois [illegible] sont saturés de chlorure de [illegible] ou de sulfate de magné[illegible]

antiseptiques :

La résistance du virus aphteux aux antiseptiques, mis à part les acides, le formol et la soude caustique, est bien connue, mais elle est, peut-être, due à la protection des tissus où se trouve le virus.

L'alcool à 50-60° a une action réduite sur le virus aphteux qui peut résister 10 h, à la température du laboratoire. La survie est variable suivant les souches, certaines ne résistant que 5 à 6 h. Cet effet est faible en comparaison de l'action bactéricide de l'alcool à 60° ; le colibacille et le staphylocoque doré sont tués en [illegible]. Les autres virus, excepté celui de la mosaïque du [illegible], sont plus sensibles que le virus aphteux à l'alcool.

OLITSKY, TRAUM & SCHOENING (1928) ont tenté de concentrer le virus par [illegible] en ajoutant de l'alcool à 60 p. 100 dans un milieu protéique ; ils pensaient éliminer en même temps les bactéries secondaires et certaines substances gênant les cultures *in vitro*. Ces essais ont échoué, car le virus alcoolisé est détruit en 5 jours.

La glycérine est considérée comme un conservateur pour les virus [illegible] en particulier pour le virus aphteux ([illegible]) : la lymphe mélangée à une solution de [illegible] (50 p. 100 d'eau), dans la proportion de 1 à 4, garde [illegible] pendant plusieurs mois. STOCKMAN & MINETT (1925) [illegible] la conservation de la virulence [illegible] thélium de pattes [illegible] infectés, immergées dans la glycérine [illegible] jours [illegible].

Mais la glycérine [illegible], par son acidité (pH 5,5) est [illegible] à la survie du virus ; ajustée à pH 7,6 et à 37°, elle ne permet pas une survie de plus de 5 jours car elle redevient très rapidement acide [illegible] la survie du virus [illegible]

A la température [illegible] beaucoup plus [illegible] (avec glycérine) [illegible]

A la glacière [illegible] parties [illegible] glycérine et ta[illegible] 7,9, [illegible] survies fort [illegible] ([illegible] jours). Des expériences [illegible] ont montré des survies de plusieurs années.

L'addition de glycérine en plus forte proportion, jusqu'à 96 p. 100, est défavorable (PYL & KLENK, 1933).

Le chloroforme à saturation est sans grande action. Le virus au 1/50, en solution saline agitée avec du chloroforme et abandonnée à la température du laboratoire, à l'obscurité, conserve son infectuosité, alors que les bactéries sont détruites. A 37°, en

tampon phosphaté M/50 (pH 7,6) et chloroformé, le virus est toujours virulent au bout de 24 h., mais non après 40 h.

<u>L'éther</u> ne tue pas le virus (émulsion d'aphtes de [illegible] le détruit en 24 h. à la température du laboratoire et à l'obscurité. La lymphe et la [illegible] résistent, pendant des heures, à l'éther absolu, à -10° et à +30° ; JANSSEN (1934) a trouvé que le virus résiste au moins 2 jours dans l'alcool-éther (7 : 3) jusqu'à une concentration de 91 p. 100.

<u>L'acétone</u> à 60 p. 100 détruit le virus, en 24 heures, à la température du laboratoire.

<u>Le phénol</u> à 0,5 p. 100 dans une solution phosphatée M/50 a une action <u>in vitro</u> plus active à 37° (destruction en [illegible] heures à pH 7,6 et en 41 heures à pH 7) qu'à la température du laboratoire (pH 7 : 21 jours). [illegible] des survies [illegible] de 107 h. (pH 7,6) et 65 h. (pH 7) à 37° [illegible] à la température du laboratoire. [illegible] ont trouvé que la lymphe contenant [illegible] reste active 5 mois. Le phénol [illegible] un broyage d'épithélium aphteux en [illegible] du laboratoire ; la lymphe diluée [illegible] dans les mêmes conditions, en [illegible]

[illegible]

[illegible] une action [illegible] teux. LOEFFLER & FROSCH [illegible] 100 rend la lymphe inactive [illegible] (1925), le [illegible] la lymphe au [illegible] en [illegible] h. [illegible] à 1 p. 100, [illegible] 100, en 5 h.

L'action [illegible] p. 1.000 sur une dilution de virus au 1/50 est sans effet pendant 24 h., mais elle détruit presque toujours, l'[illegible] du virus en [illegible]

[illegible] l'emploi du formol que [illegible]) ont atténué le virus aphteux [illegible] ses propriétés immunisantes et obtenu [illegible] le premier vaccin anti-aphteux.

L'[illegible] à [illegible] p. [illegible] détruit [illegible], à la température [illegible] le virus [illegible] en milieu phosphaté [illegible]

Le [illegible] à 1 p. [illegible] ne détruit [illegible] le virus [illegible] 7 h., mais [illegible] les [illegible] (([illegible], [illegible])

[illegible] à 1 p. 10.000 rend le virus [illegible] à la température du laboratoire.

Le citrate de soude est intéressant pour ses propri[illegible] [illegible]coagulantes.

A 0,5 p. 100, le citrate de soude exerce une action [illegible] sur le virus aphteux, à 37° ; l'addition de 0,5 p. 100 de [illegible] en milieu [illegible] réduit de [illegible] à [illegible] heures [illegible] survie du virus, selon les expériences. Des taux de 0,[illegible] p. 100 ne semblent pas altérer la survie du virus, mais il [illegible] indiqué de défibriner les sangs aphteux au lieu de les citrater si on tient à conserver intacte la virulence.

La soude caustique est le meilleur désinfectant. VALLÉE [illegible] qualifie l'hydrate de sodium d'antiseptique "idéal".

Une concentration de 0,5 p. 100 de soude caustique tue le [illegible] ni pour l'homme, ni pour les animaux. OLITSKY & BOEZ ont [illegible] le virus de la [illegible], et en 10 à 15 minutes le virus des [illegible]

[illegible] plus diluées sont actives et, [illegible] aphteux est tué en 3 heures. [illegible] officiellement préconisées pour la dés[illegible] étables sont, respectivement, 4 et 8 [illegible]

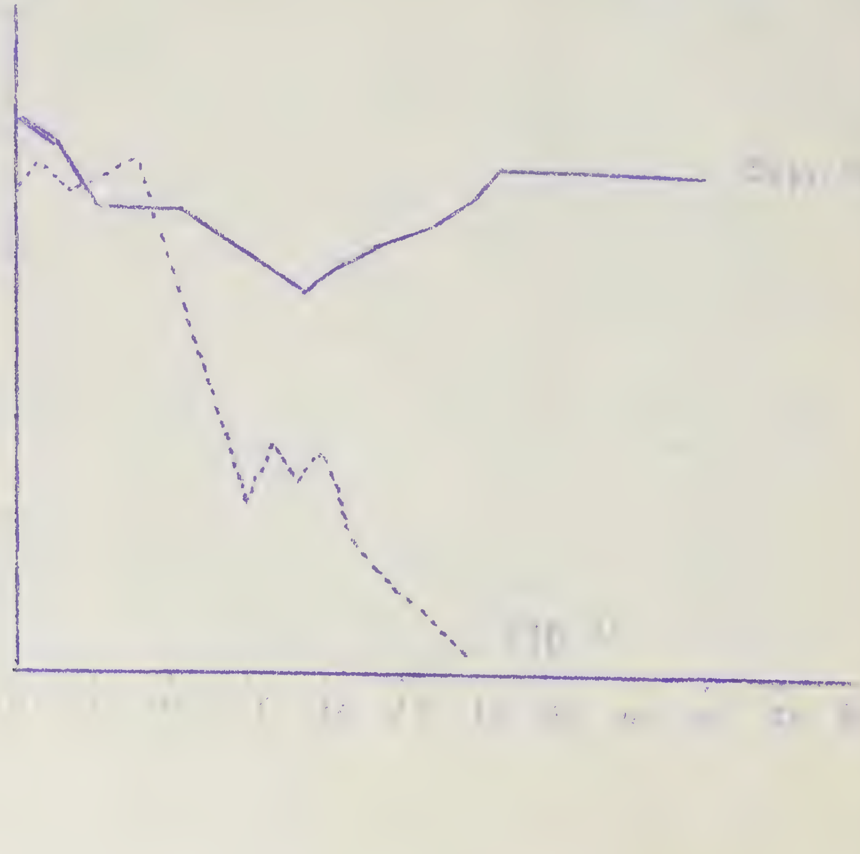
L'addition de lait de chaux à 5 p. 100 augmente l'[illegible] de contrôler aisément la désinfection. [illegible] préconise le carbonate de soude comme [illegible] 100 : le virus, sous n'importe quelle [illegible] est détruit en [illegible] minutes.

[illegible]ques se révèlent de médiocre[illegible] virus aphteux : celui-ci résiste [illegible] une solution au [illegible].000 de bichlorure de mercure et 3 h. à une so[illegible] [illegible] In vitro [illegible] talliques : sulfate de cuivre, chlorure de zinc, sulfate acide de [illegible] sante par l'essai de 90 substances chimiques : matières colorantes ou sels métalliques, à dose non toxique pour le cobaye.

La bile détruit le virus en 24 h à [illegible] et en [illegible] jours à [illegible] ([illegible], 193[illegible]).

Les fermentations bactériennes productrices de l'acide lactique sont considérées comme nocives pour le virus aphteux ; les solutions d'acide lactique à 4 p. 100 servent à désinfecter les viandes infectées (Commission anglaise). Toutefois les fermentations lactiques n'entraînent pas toujours la mort du virus. Au cours de deux de nos essais de cultures du virus aphteux sur foetus [illegible] en survie [illegible], une infection microbienne due à un prélèvement tardif de l'utérus a provoqué une acidification [illegible] du pH : au cours de l'expérience de culture [illegible] le pH du milieu de perfusion est tombé de 7,1 à 4,[illegible] ; à ce pH, la suspension virulente (broyage de peau [illegible]) est active à [illegible]. Dans l'expérience [illegible] le milieu de perfusion, à pH 7,45 au début de la perfusion, était après 10 h [illegible] d'incubation, à pH 6,6 [illegible] à pH 7 [illegible] virus, au moment de [illegible] et après la culture [illegible] ; il est resté [illegible].

Les courbes de l'évolution du pH, au cours de ces deux expériences, sont reproduites dans les figures suivantes.



[illegible] :

[illegible] l'action de diff[illegible] [illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible] étudié l'action, [illegible]
[illegible] des [illegible] respiratoires [illegible] réduc-
[illegible] survie [illegible]
[illegible]
[illegible] action [illegible] antibiotiques [illegible]
[illegible] des cultures et en favorisant la [illegible]
[illegible] [illegible]tieuses.

[illegible] et des [illegible]
[illegible]ces.

[illegible] dans [illegible] des [illegible]
[illegible] tension d'oxygène [illegible]
[illegible] du virus [illegible]
[illegible]
[illegible] du virus [illegible]
[illegible]
[illegible] l'oxygène [illegible] des [illegible]
[illegible] plus d'un [illegible] (1931) [illegible]
[illegible]
[illegible] le virus conserve son [illegible]
trois fois [illegible] (1931) [illegible]
[illegible] intensité [illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible] résultats.
[illegible]
[illegible]

[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible] de [illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]

[illegible] ont fronde, son pH est toujours de 7 [illegible]

Au bout de [illegible] nous arrêtons l'expérience et, avec chacun des [illegible] nous inoculons 2 cobayes.

L'évolution des lésions obtenues [illegible] les [illegible] tableau [illegible].

[illegible]

	[illegible]		[illegible] h.	72 h.	[illegible] h.	[illegible] h.
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	+++	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	+++		
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	+++		
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	+++	++	++
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	+++	++	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	+++	[illegible]	
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	+++	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	+++	+++	[illegible]

Ainsi [illegible] le virus [illegible] le pH s'élève légèrement et la virulence semble, dans nos conditions expérimentales, [illegible] sente des lésions [illegible]

Ce milieu de pH [illegible] est stérilisé à l'autoclave à 115° pendant [illegible] minutes ; après stérilisation le pH est ajusté à 7,2.

Formule du milieu [illegible] :

[illegible] de [illegible]	[illegible]
cystéine	[illegible]
acide [illegible]	[illegible]
glucose	[illegible]
liquide [illegible] Thomas [illegible]	[illegible]

[illegible]

[illegible] est [illegible] ayant eu une fièvre [illegible] [illegible] sont [illegible] 1/50 [illegible] dans le [illegible]. Les deux suspensions sont centrifugées 10 minutes à 5.000 tours-minute.

La virulence de la suspension non filtrée en milieu de [illegible] Thomas est éprouvée sur deux cobayes (1/2 cc. [illegible] derme au coussinet plantaire gauche). Les résultats sont consignés [illegible].

[illegible]

	Cobayes	[illegible]	48 h.	72 h.
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

- suspension virulente en milieu de J.-André Thomas à différentes dilutions : 1/50, 1/100, 1/500.

Le résultat de l'évolution de la fièvre aphteuse des cobayes est relaté dans le

TABLEAU N° 7

	[illegible]	24 h.	48 h.	72 h.	96 h.
1/50	61 62	+0 +0	+0 ++0	++A ++B	++AB ++A
1/100	65 66	+0 +0	+0 ++A	++AB ++A	mort ++A
1/500	67 68	+0 +0	++ +0	++AB +0	 +0

La suspension en milieu de J.-André Thomas et filtrée est active au 1/100 : 2 cobayes généralisés sur 2, et partiellement active au 1/500 : 1 cobaye généralisé sur 2.

- suspension virulente en milieu réducteur.

La suspension au 1/50 est éprouvée sur 2 cobayes dont l'évolution aphteuse est donnée dans le

TABLEAU N° 8

	Nos	24 h.	48 h.	72 h.	96 h.
1/50	69 70	+0 +0	++ +0	++A +0A	++A ++AB

La suspension de virus en milieu réducteur est active au 1/50 : 2 cobayes généralisés sur 2, mais l'évolution de la fièvre aphteuse semble ralentie par rapport à celle provoquée par le virus en liquide de J.-André Thomas.

Le lot III est préparé en diluant, à parties égales, une certaine quantité de la suspension de virus en milieu réducteur et [illegible] de bovin sain (le virus se trouve donc, dans ce 3ème lot, en dilution au 1/100.

Cette suspension sanguine est éprouvée sur 2 cobayes et le résultat de l'inoculation est noté dans le

TABLEAU N° 9

	[illegible]	[illegible]	48 h.	72 h.	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	

[illegible]

[illegible] été conservés [illegible]

[illegible] épreuve de virulence [illegible]

TABLEAU N° 10

	Cob.	Heures			Jours						
		24	48	72	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible] de rechercher l'immunité des cobayes [illegible] ayant présenté [illegible] lésions [illegible] généralisées. Ils ont été éprouvés 15 jours plus tard avec un virus [illegible] passage témoin sur cobayes. Le résultat de cette épreuve est résumé dans le

TABLEAU N° 12

		Cob.	24 h.	48 h.	72 h.	96 h.	120 h.
	Virus témoin - cobayes neufs	82 83	+0 +0	++± ++±B	+++	++±	++±
48 h	Milieu réducteur mil. réduct. sanguin	[illegible] [illegible]	+0 +0	+0 +±B	+±	++±	++±
112 h	Milieu salin Milieu réducteur Mil. réduct. sanguin	[illegible] 80 81	+0 +0 +0	+0 +0 +0	+0 +0 [illegible]	±0 +0 [illegible]	+0 +0 ++±

Les cobayes ont présenté des lésions de généralisation, sauf 2 (n° 79 et 80) qui, auparavant, avaient reçu la suspension de virus en milieu salin et en milieu réducteur conservée 112 h. à 36°5.

En résumé, la suspension virulente en liquide physiologique de [illegible] filtrée sur Seitz, est active au 1/500 ; conservée 48 h. à 36°5, la dilution au 1/50 est active, mais elle ne l'est plus après 112 heures à 36°5.

En milieu réducteur, la conservation de 48 heures à 36°5 atténue la virulence. Après 112 heures, la suspension n'est plus active.

En milieu réducteur sanguin, la suspension au 1/100 est peu active après 48 heures de conservation ; après 112 heures la suspension n'est plus active.

Notons que sur tous les cobayes négatifs l'inoculation d'un virus actif provoque la généralisation, sauf sur les cobayes ayant reçu, préalablement, de la suspension virulente en milieu salin, ou en milieu réducteur, conservée pendant 112 heures à 36°5.

En conclusion, un milieu réducteur à base de pyruvate [illegible] influence défavorable sur la survie du virus [illegible]

[illegible]

[illegible] substance [illegible] *in vitro* [illegible]

[illegible] l'intoxication [illegible] de quelques jours [illegible] ne trouve [illegible] les [illegible] visibles [illegible]

[illegible] *in vivo* [illegible] *in vitro* [illegible] verrons [illegible] dans nos expériences [illegible] à forte dose [illegible] assuré [illegible] 3 000 000 [illegible]

[illegible] l'expérience [illegible]

[illegible]

[illegible]

	[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

Tous les cobayes ont présenté des lésions de généralisation [illegible]

In vivo.

1/2 cc. de la suspension précédente de virus à 10 [illegible] est inoculé à 6 cobayes :

3 servent de témoins

3 reçoivent, matin et soir, par voie intramusculaire 2.500 U.O. de pénicilline G.

3 autres cobayes témoins, sans virus, subissent le même traitement de pénicilline G.

L'apparition des lésions, pour chaque cobaye, est donnée dans le

TABLEAU N° 14

	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Témoins + virus		[illegible]	+AP			
		[illegible]	+A	++	++	+++
		[illegible]		[illegible]	+AP	
Traitement à la pénicilline	[illegible]	0		+AP		mort
		+	[illegible]	+AP		
		+	[illegible]	[illegible]	+	+++

Les cobayes, traités ou non, ont eu une maladie [illegible] [illegible] l'inefficacité de la pénicilline

On peut considérer que, dans nos conditions expérimentales, la pénicilline G n'a aucune action in vitro [illegible] in [illegible] l'évolution de la fièvre aphteuse chez le [illegible]

L'[illegible] des cobayes traités et leur nom[illegible] [illegible] alors qu'aucun témoin ayant reçu l[illegible] [illegible] à penser que la pénicilline [illegible] notre expérience.

[illegible] et la chloromycétine n'ont aucune [illegible] vivo sur le virus aphteux. Les e[illegible] [illegible] trouvent que l'on peut en mettre [illegible] [illegible] streptomycine par litre [illegible] mgr. de chloromycétine par litre [illegible] [illegible]

L'[illegible] [illegible] ... in vitro, sur la souche [illegible] du virus [illegible] (dilution 10^{-1}, contact 1 h. à 37°), mais elle n'a aucune action sur [illegible]. In vivo, [illegible] ... elle prévient [illegible] ... [illegible]

Les [illegible] ... base de [illegible] ... 26° [illegible] ...

[illegible]

[illegible] LEVADITI, certains sulfamides : l'acide 4. sulfamido- [illegible] ... de généralisation [illegible]

N[illegible] ...

In vivo.

[illegible] ... [illegible] ... [illegible]

[illegible]

	[illegible]	1	2	3	4	5	6	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]				
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	

[illegible] ...

[illegible] généralisée.

[illegible]

TABLEAU No [illegible]

	[illegible]	[illegible]	2 j.	3 j.	4 j.	5 j.	6 j.	7 [illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]			
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

[illegible]

[illegible] tions de [illegible]

[illegible]

TABLEAU No [illegible]

	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Témoin	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

[illegible] de traitement.

[illegible] n'a pas d'action *in vivo* [illegible] [illegible] ou curative sur l'évolution aphteuse du cobaye. [illegible] *in vitro*, [illegible]

Action des sulfones :

[illegible] sulfone [illegible] (D.D.S.) ne [illegible] pas [illegible] de traitement *in vivo* [illegible] tentées [illegible]. Dans les deux expériences, le virus est [illegible] type [illegible] passage [illegible] cobaye, dilué [illegible] de J.-André Thomas ; la sulfone est donnée *per os* à la dose de 0,50 gr., 6 fois par jour (soit 3 gr. par Kg. de cobaye).

Résultat des inoculations de la 1ère expérience :

TABLEAU N° 18

Cob.	1 j.	2 j.	3 j.	4 j.	5 j.	6 j.	7 j.	8 j.	9 j.	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]							
[illegible]	[illegible]	[illegible]	+0	++A						
[illegible]	[illegible]	[illegible]	++A							
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	+0	+0	+0	+0	+0	
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	++	[illegible]	++	mort			
[illegible]	[illegible]	[illegible]	+0	+0	++	++A				

La 2ème [illegible] a été entreprise en raison du retard de [illegible] [illegible] aphteuses dans la 1ère expérience. Ses résultats sont [illegible]

TABLEAU N° 19

	Cob.	1	2	3	4	5	jours
Témoins	223	+0	+0	++	++A		
	224	+0	+0	+0	+0	+0	
	226	+0	+0	++	++A		
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	++A	++A		
Traités *per os* 3 gr./kg.	227	+0	+0	++AR			
	228	00	+0	+0	+0A	+0A	
	229	+0	+0	+0	+0	+0	
	230	00	+0	+0	++	++A	

[illegible] de la fièvre aphteuse chez les cobayes témoins et les cobayes traités est sensiblement la même [illegible] [illegible] dans la fièvre [illegible]

[illegible] :

[illegible] pouvaient être respon[illegible] [illegible] (infections à microbes [illegible]) [illegible] il était impor[illegible]tant [illegible] la fièvre aphteuse chez le cobaye. Nos expériences ont montré, au contraire, que les différents anti[illegible] sont indifférents [illegible] le ralentissement de l'évolution aphteuse.

[illegible] antihistaminiques de for[illegible] (1) et par différentes voies d'introduction : parentérale, buccale ou locale, par frictions.

Le virus aphteux employé est de type O, le plus souvent d'origine bovine, dilué de 10^{-2} à 10^{-3}.

Nous avons essayé l'action des antihistaminiques avec différentes concentrations virulentes. Les animaux sont traités dès l'inoculation du virus.

Le [illegible] de N diméthylamino éthyl N benzyl aniline, que nous intitulerons antihistaminique n° 1, ou a. H. 1 est injecté, en solution à 1,25 p. 100 par voie sous-cutanée, à raison de 40 à 50 mgr., selon les expériences, par kg. de poids vif de cobaye. Le traitement dure [illegible] jours, il n'intoxique pas les animaux. L'a. H. 1 est sans action.

Dans la 1ère expérience les cobayes ont présenté des lésions de généralisation légèrement plus rapides et, dans le [illegible], [illegible] un plus grand nombre de cobayes, l'a. H. 1 a eu tendance à retarder l'évolution [illegible] par rapport aux témoins.

1ère expérience.

L'évolution de la fièvre aphteuse chez les cobayes témoins et traités est résumée dans le tableau n° 20. (voir p. 75).

L'examen de ce tableau prouve que les 8 cobayes ont eu des lésions aphteuses généralisées, les traités un peu plus [illegible] que les témoins.

---

(1) Nous tenons à remercier Messieurs BRUN, CEBE & [illegible] de nous avoir procuré ces produits.

Chez les témoins (virus), aux dilutions de 10^{-2}, 5.10^{-3} et 10^{-3}, tous les cobayes ont généralisé en 2 à 3 jours. Chez les traités, tous les cobayes ont eu des lésions de généralisation le 3ème ou le [illegible] jour.

Le maléate acide de [illegible] éthyl à paraméthoxybenzyl-amino pyridine (a. n° 2) a été injecté, par voie sous-cutanée, en solution à 2,5 p. [illegible], à raison de [illegible], pendant 8 à 9 jours.

Nous avons pensé que la différence de concentration du virus pourrait amener une différence d'action de l'antihistaminique ; nous avons donc entrepris l'expérience avec des dilutions de 10^{-3} et $5.10^{-[illegible]}$.

Le résultat des inoculations est résumé dans le tableau 22 (voir page 78).

Dans [illegible] le virus est dilué à [illegible] au bout de la 8ème [illegible] (8ème jour), 2 cobayes ont présenté des troubles nerveux qui se sont terminés par la mort 15 et 60 [illegible] après l'injection ; il semble que [illegible] puisqu'ils ne présentaient, l'un qu'un aphte primaire, l'autre aucune infection aphteuse. Dans cet essai, l'apparition des lésions primaires, chez les traités, est retardée [illegible] témoins, mais les lésions de généralisation [illegible] être comparées.

[illegible], mais avec le virus à [illegible] sont retardées de 7, 6 [illegible] de 2 cobayes).

[illegible] semble manifeste, [illegible] de la toxicité.

[illegible] l'action de la N diméthyl amino [illegible] (a. n°3), sur le virus [illegible]

[illegible]

[illegible] sont mélangés à 10 cc. [illegible] virus aphteux de type O de [illegible]. Le mélange devient trouble [illegible] coagulation des protéines de la suspension [illegible] cc. de la solution de [illegible] 10 cc. d'eau distillée ou 10 cc. d'eau [illegible] provoquent aucun trouble, et à 10 cc. de

TABLEAU N° [illegible]

	Virus C bovin [illegible]	Cob.	1 j.	2 j.	3 j.	4 j.	5 j.	6 j.	7 j.	8 j.	9 j.	10 j.	11 j.	[illegible]
[illegible]		157	+0	+0	+0	+0	+0	00	00	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	
		158	+0	[illegible]	++A?	++A								
		159	[illegible]	[illegible]	+0	+0	++A?	++A						
	[illegible]	160	00	00	00	00	00	00	00	00	00	[illegible]	[illegible]	
		161	00	00	++A?	+0A?	+0A							
		162	00	00	00	00	00	00	[illegible]	++	++B			
[illegible]	[illegible]	163	00	00	00	00	00	00	00	0+	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
		164	00	00	00	00	00	00	00	++A				
[illegible]	[illegible]	166	00	00	00	+0	++A							
		[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]		t (*)				
		168	00	+0	+0	+0	+0	+0		t (**)				

arrêt du traitement

(*) mort 60 m. après l'injection du produit
(**) mort 15 m. après l'injection du produit

TABLEAU N° 23

	Cob.	1 j.	2 j.	3 j.	4 j.	5 j.	6 j.	[illegible]
[illegible]	[illegible]4	[illegible]	[illegible]	00	00	00	[illegible]	00
	[illegible]5	[illegible]	[illegible]	00	00	00	00	00
[illegible]	[illegible]6	[illegible]	[illegible]	00	[illegible]	00		00
	[illegible]7	+0	00	+0	++AB			
	[illegible]8	[illegible]	+0	+0	+0	+0	00	00

L'injection de la solution virus + a. n° 3 provoque une réaction inflammatoire [illegible] la région plantaire. La solution témoin [illegible] moins importantes.

[illegible] n° 3, in vitro, détruit l'activité pathogène du virus aphteux puisqu'aucun [illegible] 1 cobaye et provoque un aphte primaire pour un autre.

[illegible]

[illegible] dbe [illegible]

[illegible]			2 g.	3 g.	4 g.
[illegible]					

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible] premier, nous avons [illegible] [illegible]

[illegible]

[illegible] proposition [illegible]

[illegible]

[illegible] une [illegible]

[illegible] chaque [illegible]

[illegible]

[illegible] genre [illegible] autres colonnes [illegible]

[illegible]

	[illegible]	0 [illegible]	1 [illegible]	2 [illegible]	3 [illegible]	4 [illegible]	5 [illegible]	6 [illegible]	7 [illegible]
	10^{-2}	100	+0	+003	+003	[illegible]	[illegible]		
[illegible]		100	+0	+0	+0	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	5.10^{-2}	[illegible]	[illegible]	+0	+0	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
		[illegible]	[illegible]	+0	+0	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	100	[illegible]	[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

[illegible]

-2 -2 -3

[illegible]

TABLEAU N° 26

Virus C	Cob.	1 j.	2 j	3 j.	4 j.	5 j.	6 j.	7 j.	8 j.	9 j.	10 j.	11 j.	[illegible] j.
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	+0	+0	+0	00	00	00	00	00	00	00
$10^{-[illegible]}$	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	++A?								
	[illegible]	[illegible]	[illegible]		[illegible]	++A?	++A						
	[illegible]	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
10^{-3}	[illegible]	00	+0	+0A?	+0A?	+0A	++A						
	62	00	00	00	00	00	00	00	++	++A			
	[illegible]	00	00	00	00	00	00	+0	+	++A			
10^{-2}	[illegible]	[illegible]	[illegible]	00	[illegible]	[illegible]	++	+++					
	171	00	00	00	00	00	00	00	[illegible]	00	00	00	00
	172	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
10^{-2}	[illegible]	[illegible]	[illegible]	+0	+0	+0	++	+++					
	[illegible]	[illegible]	00	00	00	00	[illegible]	[illegible]	[illegible]	+0	00	00	00

arrêt du traitement

[illegible] n° 4 ralentit l'apparition des lésions primaires et la [illegible] mais [illegible] les [illegible] aires.

Cette action est assez nette dans notre expérience, mais le virus est à la limite de son activité.

- 1 série de 3 cobayes inoculés de virus à 5.10^{-2} sont traités par frictions des coussinets antérieurs et postérieurs matin et soir, avec un onguent à 5 p.100 de produit actif.

Dans le tableau n° 28 nous avons groupé l'évolution aphteuse de tous ces cobayes.

TABLEAU N° 28

	Virus O bovin	Cob.	1 j.	2 j.	3 j.	4 j.	5 j.	6 j.	[illegible]
Témoins virus	10^{-2}	109	+0	++AB	mort				
		110	+0	+0	++AB				
		111	+0	++A	++AB				
	5.10^{-2}	112	+0	++	++A	++A	++A	++A	[illegible]
		113	+0	++A	++A	++A	++A	mort	
		114	+0	++A	mort				
	10^{-3}	115	+0	+0	++A	++A	++A	++A	[illegible]
		116	+0	++AB					
		117	+0	+0	++A	++A	++A	++A	[illegible]
Traités a. n° 5 [illegible]	10^{-2}	130	mort						
		131	+0	+0	++A	++A	++A	++A	[illegible]
		132	00	+0	+0	+0	+0	+0	[illegible]
	5.10^{-2}	133	+0	+0	+0	+0	+0	+0A	[illegible]
		134	+0	+0	++	++A?	++A	++A	[illegible]
		135	00	00	00	0C	00	++A	[illegible]
	10^{-3}	136	00	+0	+0	+0	+0A	[illegible]	[illegible]
		137	00	00	00	0C	mort		
		138	+0	+0	+0	C0	00	00	[illegible]
Témoins a. n° 5 40mg./kg.		139							[illegible]
		140							[illegible]
		141							[illegible]
Traités friction a. n° 5	5.10^{-2}	142	00	00	+0	+0	+0	+0A	[illegible]
		143	00	00	00	00	00	+0A	[illegible]
		144	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

arrêt du traitement

Ce tableau prouve l'action nettement retardatrice de l'a. n° 5 sur l'évolution aphteuse du Cobaye puisque, par exemple au 5ème jour du traitement (colonne du 4ème jour d'examen), sur les 3 cobayes inoculés avec du virus à 10^{-3}, un [illegible] alors que les [illegible] sont [illegible] [illegible] est également très intér[illegible] au 6ème jour de traitement [illegible] [illegible] généralisé, alors que les témoins sont tous les 3 généralisés depuis 3 jours.

[illegible] : traitement par voie [illegible]rale et par frictions :

[illegible] 5.10^-2 et 10^-3 , chacune [illegible] 9 cobayes [illegible] par injection sous-cutanée de [illegible] 3 sont traités par frictions [illegible] les 3 autres cobayes [illegible] de témoins. [illegible]

Les résultats [illegible]

TABLEAU N° 21

	[illegible]	Cob	1 j	2 j	3 j	4 j	5 j	6 j	7 j	8 j	9 j	10 j	11 j	12 j
[illegible]oins	5.10^-2	157	+0	+0	+0	+0	+0	00	00	00	00	00	[illegible]	[illegible]
		158	[illegible]	+0	+0A?	++A								
		159	[illegible]	+0	+0	+0	++AY	++A						
	10^-3	160	[illegible]	[illegible]	00	00	00	00	00	00	00	00	[illegible]	[illegible]
		161	[illegible]	+0	+0A?	+0A?	+0A	++A						
		162	[illegible]	[illegible]	00	00	00	00	00	++	++A			
[illegible]ités [illegible] s-c [illegible] n° 5 [illegible] mg./Kg	5.10^-2	175	[illegible]	00	00	00	00	00	00	00	00	+0	[illegible]	[illegible]
		176	[illegible]	+0	+0	+0	+0	+0	++	++	++A			
		177	[illegible]	[illegible] †										
	10^-3	178	[illegible]	[illegible]	00	00	00	+0	+0	+0	+0	+0A?	[illegible]	[illegible]
		179	[illegible]	00	00	00	00	00	00	00	00	00	[illegible]	[illegible]
		180	00	[illegible]	00	00	00	00	00	00	00	+0	[illegible]	[illegible]
[illegible]ités [illegible] frictions [illegible]ment [illegible] 100	5.10^-2	181	[illegible]	+0	+0	+0A	+0A	++A						
		182	[illegible]	[illegible]	00	00	00	00	00	mort				
		183	[illegible]	[illegible]	00	00	00	00	00	[illegible]	00	00	+0	[illegible]
	10^-3	184	[illegible]	[illegible]	00	00	00	00	00	[illegible]	+0	+?0	+?0	[illegible]
		185	[illegible]	[illegible]	00	00	00	00	00	[illegible]	00	00	00	[illegible]
		186	[illegible]	[illegible]	00	00	00	00	00	[illegible]	00	00	00	[illegible]

arrêt du traitement

[illegible] confirme les 2 [illegible] et [illegible] le virus [illegible] au bout de 4 à [illegible] jours et [illegible] de 3 et [illegible] jours. Les résultats sont plus nets [illegible] 10^-[illegible] [illegible]lise en 7 jours, et aucun [illegible] 5.10^-2 [illegible]ralise en 4 jours [illegible]

[illegible] permettent [illegible] affirmer que l'a. n° 5 [illegible] 1a [illegible] au virus.

Toutes nos expériences et nos résul[illegible] dans le tableau n° 30 (voir page 83).

[illegible] sur 100 [illegible] plus petit nombre de cobayes, on peut, toutefois, en déduire, [illegible] antihistamini[illegible] l'a. n° 5, [illegible] l'apparition et la géné[illegible] virulence [illegible] sont plus petits que chez les témoins. Avec un virus à la limite de son activité, l'a. n° 5 peut même, dans certains cas éviter l'infection aphteuse du cobaye inoculé. L'action de l'a. n° 5 est aussi nette par injection parentérale que par simple friction des coussinets.

Cette action favorable de certains/anti histaminiques [illegible] connaissance, puisque, au contraire, les antihistaminiques sont con[illegible] de certains microbes et virus.

TABLEAU N° 30

Antituberculinique			Virus			Cobayes						Résultats (jours de retard (r) ou d'avance (a) de l'apparition des lésions)		Conclusion
[illegible]	Dose mg/kg par l'animal d'intro-duction	Durée du traite-ment	Type	Adap-tation	Titre	Nbre total	Nbre à lé-sions primaires	Nbre à lé-sions génér.	Nbre total	Nbre à lé-sions primaires	Nbre à lé-sions génér.	précoces	génér.	
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	bov.	10^{-2}	2	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	2,2[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	5.10^{-2}	2	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	$10^{-[illegible]}$	3	[illegible]	[illegible]	[illegible]	3	[illegible]		1[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	$10^{-[illegible]}$	3	[illegible]	[illegible]	[illegible]	3	1	[illegible]	1,[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	10^{-3}	3	[illegible]	[illegible]	[illegible]	3		0,[illegible]	0,[illegible]	"
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	5.10^{-2}	3	[illegible]	2	2	1	[illegible]	[illegible]	1,[illegible]	"
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	10^{-3}	3	[illegible]	2	[illegible]	2	1	[illegible]	2 [illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	cob.	10^{-2}	2	[illegible]	[illegible]	[illegible]	2	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	bov.	10^{-2}	3	[illegible]	[illegible]	[illegible]	3	[illegible]	[illegible]	0,5	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	10^{-2}	3	[illegible]	[illegible]	[illegible]	3	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	10^{-3}	3	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,6 [illegible]	"
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	"
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	"
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	"
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	"
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	"
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	"
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	"
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	3	2	2	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	"
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	"
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	4[illegible]	[illegible]	[illegible]

[illegible]

L'étude des propriétés biologiques du virus aphteux n'a pas fait l'objet de recherches personnelles approfondies de notre part, aussi n'en donnerons-nous qu'un résumé afin de permettre une meilleure compréhension de notre sujet principal.

a) Pouvoir pathogène :

La fièvre aphteuse

Le virus aphteux n'est décelable que par son pouvoir pathogène. Il détermine chez les espèces sensibles, principalement bovine, [illegible] une maladie [illegible] : la fièvre aphteuse.

Nous allons suivre les étapes successives de la marche du virus dans l'organisme sensible : son introduction, sa propagation, [illegible] les symptômes et lésions qu'il provoque, enfin son élimination [illegible] fermant ainsi son cycle [illegible]

Introduction du virus dans l'organisme :

L'infection naturelle se fait, en général, par ingestion [illegible] virus [illegible] même [illegible] il n'est pas prouvé que les [illegible] soient nécessaires surtout pour l'infection des muqueuses, [illegible] par les aliments et les [illegible] par simple contact [illegible] plus rapide et plus [illegible]

L'infection [illegible] par [illegible]

[illegible] les lésions de généralisation sont absentes [illegible]

Période d'incubation

Dans l'infection naturelle, la durée d'incubation [illegible] 7 à 21 jours [illegible] elle est en moyenne de 3 jours, [illegible]

cette période de temps au Laboratoire, lors d'introduction d'animaux réceptifs dans un milieu infecté (au cours d'identification de virus ou d'épreuves de vaccination).

Expérimentalement, nous avons observé des périodes d'incubation courtes : 16 à 20 heures ; presque toujours [illegible] l'apparition des aphtes au bout de 24 h. et la fièvre en 30 h. Après 60 h. il faut craindre une infection accidentelle. Par les autres voies d'inoculation, le temps d'incubation [illegible] le mauvais état des animaux retardent l'apparition des lésions aphteuses.

Propagation du virus dans l'organisme :

Au point d'inoculation, le virus détermine l'apparition d'un ou plusieurs aphtes primaires ; le virus se multiplie à ce niveau et se déverse dans le sang. La fièvre [illegible] le virus [illegible] tout l'organisme. Le virus, d'un dermotropisme accentué, [illegible] d'inoculation, en ses lieux de prédilection : langue, gencives, mufle, onglons et pis, où il se forme des aphtes secondaires [illegible] la fièvre tombe rapidement et le sang perd sa virulence. Dans les formes malignes, le virus attaque les muscles cardiaque et squelettiques. L'injection intraveineuse ne rend pas, d'emblée, le sang virulent, les aphtes primaires apparaissent au niveau des sièges de prédilection, surtout si ceux-ci sont scarifiés.

Cette pathogénie de la fièvre aphteuse, bien schématique, laisse beaucoup de points inconnus ; elle devra être reprise à la lumière des données physico-chimiques des études virologiques récentes.

Symptômes cliniques :

Chez les bovins, l'inoculation expérimentale permet de suivre, mieux que dans l'infection naturelle, la succession des symptômes.

L'inoculation de virus aphteux dans la muqueuse de la langue, telle que nous la pratiquons au Laboratoire de Recherches d'Alfort (450 inoculations personnelles) est suivie d'une sécheresse et d'une congestion des muqueuses buccales puis, en 20 à 24 heures, de l'apparition d'aphtes primaires [illegible] aux points d'inoculation. La salivation [illegible] symptômes généraux sont peu graves : [illegible] inappétence. La température normale a tendance [illegible]

[illegible] à 7 h. après l'apparition des premiers aphtes primaires.

[illegible] cette observation personnelle est le résultat de [illegible] au cours de nos inoculations expérimentales. Jusqu'ici on considérait que la fièvre précédait de 24 à 48 h. l'apparition des premières manifestations éruptives de la maladie. C'est, en effet, ce que l'on observe dans les cas d'infection naturelle, mais nous pensons que c'est parce que l'on ne pensait pas à mettre en évidence l'aphte primaire au point d'inoculation qui peut passer inaperçu, être interne, par exemple au niveau du rumen dans le cas d'infection par les aliments.

La température atteint et dépasse 41° (moment du prélèvement de sang virulent). Les aphtes sont des vésicules constituées par le décollement, sur 1 à 2 cm^2, de l'épithélium de la muqueuse [illegible] remplies d'un liquide clair : la lymphe aphteuse. Les aphtes [illegible] plus ou moins, selon l'activité de la suspension virulente (moment du prélèvement de la lymphe et de la paroi des aphtes). La température [illegible] à baisser, puis à remonter lorsque [illegible] de nouveaux aphtes (aphtes secondaires (1)) apparaissent sur les gencives, le bourrelet de la mâchoire supérieure, le mufle, le palais : il y a généralisation de la fièvre aphteuse (2). La fièvre se maintient quelques heures puis la température [illegible], le clocher thermique dure environ [illegible] jours. L'évolution des aphtes est rapide, en 1 ou 2 jours, leurs parois blanchissent, leur contenu se trouble puis le 3ème ou le 4ème jour les parois se déchirent par ramollissement des tissus et le frottement des dents ou des aliments. La salive est abondante, elle [illegible] [illegible] à l'extérieur et un bourrelet de mousse [illegible] entoure les lèvres [illegible] sont entendus [illegible] de succion caractéristique.

24 à 48 h après l'apparition des aphtes primaires, les [illegible] secondaires peuvent apparaître au niveau des onglons d'un ou plusieurs membres [illegible] dans l'espace interdigité et [illegible], plus petits [illegible] stade, l'animal [illegible] et boite. La diarrhée [illegible] [illegible] de la maladie. Le bovin [illegible] [illegible]

[illegible] l'ordre assez rapidement [illegible] irrégulièrement des lambeaux [illegible] [illegible] vif ; elles se recouvrent [illegible] [illegible] (3). La cicatrisation est très [illegible] l'évolution [illegible] est de [illegible] jours, la cicatrice, minime [illegible]

---

(1) Les aphtes primaires sont, en général, plus virulents et [illegible] titre plus élevé que les aphtes secondaires.

(2) Chez les [illegible] infectés de fièvre aphteuse, la vitesse de sédimentation des globules rouges augmente à partir du 2ème jour après l'infection, le maximum est atteint entre le 5ème et le 7ème jour, pour diminuer ensuite rapidement et revenir à la normale entre le 10ème et le 20ème jour (OSIELSKI, 1950).

(3) Dépôt pris souvent, à tort, pour l'épithélium de l'aphte, mais qui n'est pas virulent.

rapport à la plaie, disparaît complètement en moins d'un mois.

Dans les conditions d'infection naturelle, la différenciation des aphtes primaires et secondaires est difficile, les premiers passent souvent inaperçus, ils siègent, de préférence, sur les gencives.

Les symptômes sont variables selon les épizooties ; la fièvre aphteuse peut revêtir une forme bénigne avec des symptômes frustres pouvant passer presque inaperçus, ou des formes graves avec multiples localisations des éruptions et diverses complications.

Les localisations digitées sont fréquentes, la suppuration qui s'établit souvent retarde la cicatrisation et est l'origine de complications fréquentes : abcès interdigités, décollement, puis chute des onglons.

Chez les vaches laitières se rencontre la localisation mammaire [illegible] de préférence sur le trayon. Elle peut être suivie de mammite dûe aux traites douloureuses et incomplètes.

Nous n'avons observé d'autres localisations d'aphtes que sur la muqueuse du museau. Toutefois il est certain que l'on peut rencontrer des aphtes sur toutes les muqueuses, y compris celles des voies respiratoires.

Selon les épizooties, les [illegible] cardiaques sont plus ou moins fréquentes ; des animaux meurent brusquement, [illegible] sans prodromes, des aliments dans leur bouche. Les formes graves à localisations variables, sont rares mais se rencontrent parfois : forme [illegible] peuvent mourir en [illegible] avec asphyxie, bronchopneumonie, gangrène du poumon et mort en 3 à 6 jours ; forme nerveuse avec tremblements musculaires, grincements des dents, paralysie du train postérieur, état comateux. Enfin des complications de tous ordres sont observées, avec plus ou moins d'intensité ; mais chaque complication est spécifique peut-on dire, d'une épizootie : avortements, [illegible] intramusculaires, [illegible] dont le bacille de [illegible] est le principal responsable. Le virus aphteux favorise la "sortie" de germes [illegible] salmonella etc. THIERY et DRIEUX (1950) ont décelé une réaction périfocale provoquée, [illegible] par l'inoculation de virus aphteux.

[illegible]

Dans sa forme classique, la fièvre aphteuse évolue en 6 à 8 jours. Peu à peu, l'animal reprend ses forces,

[illegible] et son embonpoint préalable qu'après 1 à 2 mois, dans les cas bénins et sans complications. La mortalité ne dépasse pas 2 à 5 p. 1 000. La gravité tient surtout aux complications qui diminuent le rendement en lait, viande et travail. Certaines épizooties, heureusement rares, à formes malignes provoquent des pertes de 30 à 60 p. 100.

Lésions :

Lésions anatomo-pathologiques :

L'aphte des muqueuses et de la peau est la lésion essentielle. Il résulte d'une congestion locale suivie de l'exsudation d'un liquide séreux qui, en soulevant l'épiderme, forme une vésicule. La cicatrisation est rapide et ne laisse, comme trace, qu'une décoloration des parties cutanées pendant 2 ou 3 mois (taches de crapaud) ; parfois des germes secondaires compliquent la lésion qui s'ulcère, se recouvre de [illegible] ; la cicatrisation est retardée et l'animal ne peut manger.

Dans les cas graves, les altérations : plaques hémorragiques et aphtes se retrouvent sur les muqueuses du tractus digestif, en particulier sur les piliers du rumen. Les veaux s'infectent en tétant et présentent des lésions gastro-intestinales qui déterminent souvent la mort. Le système respiratoire peut être lésé : trachéobronchite, congestion pulmonaire, bronchopneumonie.

A l'autopsie des animaux morts (forme maligne), la plèvre et le péricarde [illegible] un liquide séreux (en quantité importante surtout chez le porc), le coeur est "tigré" couvert d'ecchymoses, le myocarde est décoloré, friable et criblé de petites taches d'un blanc jaunâtre (A l'abattoir, sur les animaux guéris, ces taches se retrouvent sous forme [illegible]). Le foie peut être dégénéré, la rate légèrement hypertrophiée, ramollie et de teinte rouge foncé. On trouve parfois, aux abattoirs, des nodules de 1 à 2 cm. de diamètre dans les muscles du squelette, ils peuvent être rapportés à une atteinte plus ou moins ancienne de fièvre aphteuse.

Lésions histo-pathologiques :

L'aphte commence à se développer dans l'épiderme au niveau du corps muqueux de Malpighi (stratum spinosum) ; sous l'action du virus, la zone intéressée se congestionne et s'infiltre de sérosité. L'exsudation plasmatique forme de petites lacunes en écartant les cellules de la couche malpighienne ; celles-ci dégénèrent et se lysent, leurs noyaux se pycnosent et la substance cellulaire se disperse en petits granules. Les petites lacunes confluent pour former la vésicule, celle-ci repose sur la couche germinative et s'élève jusqu'à la couche [illegible] (stratum lucidum), elle soulève la couche cornée de l'épiderme. Tout autour de la vésicule s'installe une infiltration de leucocytes polynucléaires. La lymphe contenue est un exsudat clair, ambré, tenant en suspension quelques leucocytes et cellules épithéliales.

L'examen histologique du coeur "tigré" montre une myocardite [illegible]

foyers de dégénérescence parenchymateuse et d'infiltration leucocytaire.

Au niveau de l'hypophyse il a été signalé des foyers d'infiltration lymphocytaire.

Inclusions cellulaires : la présence d'inclusions cellulaires est niée par la plupart des auteurs. Les inclusions décrites dans les noyaux des cellules épithéliales par GINS (1929) sont retrouvées, par différents auteurs, qui leur dénient tout rôle spécifique. EPSTEIN & TOSI (1943) décrivent, dans les cellules épithéliales d'aphtes (cobayes et bovins), des inclusions éosinophiles de 1 à 4 µ. Ces inclusions se rencontrent aussi en dehors des cellules ; les auteurs n'apportent pas la preuve de leur spécificité

Elimination du virus aphteux par l'animal atteint - Produits virulents :

Les secrétions et les excrétions : salive, urine, lait, jetage, larmes, sont virulentes dès l'apparition primaire, avant tout signe clinique visible. La lymphe et le sérum des aphtes sont les produits les plus riches en virus ; leur virulence disparaît rapidement, en 4 à 12 jours. Le sang (plasma, sérum, globules), au cours de l'évolution thermique, est virulent, mais son infectuosité est [illegible] fois moins élevée que celle des aphtes. Le lait, l'urine, les fèces, la bile, le liquide [illegible] le virus d'une façon irrégulière, [illegible] durée de quelques heures.

Certains organes sont pathogènes au cours de la généralisation (glandes salivaires, poumon, foie, rate, ganglions lymphatiques, cerveau, capsules surrénales), les muscles ne le sont pas ; les reins, testicules ou ovaires ne le sont pas toujours. Le temps de virulence des organes est très court : 24 ou 48 h. au maximum ; la présence du sang n'est, peut-être, pas étrangère à la virulence de certains organes, du foie par exemple.

Le virus est donc éliminé des animaux malades au début de la maladie, avant même l'apparition de tout symptôme (VALLÉE 1929), nous ajouterons symptôme visible, en raison de la possibilité d'aphtes primaires internes. La période de contagiosité d'un malade n'est pas longue [illegible] (l'excrétion spontanée n'excède pas, dans la majorité des cas, 4 à 8 jours après la rupture des aphtes ([illegible] 1931). L'inoculation d'exsudats recueillis [illegible] où les aphtes sont en voie de cicatrisation n'est pas virulente (essai sur 60 bovins, [illegible] 1944).

La question des porteurs de virus, longtemps discutée, est maintenant admise ; quelques sujets convalescents peuvent rester infectants pendant plusieurs mois (BURGI, 1928, FLUCKIGER, 1934...). WALDMANN, TRAUTWEIN & PYL (1931) admettent qu'à côté des porteurs de germes passifs peut-on dire, qui hébergent le virus dans des lésions podales, dans leurs poils..., il existe des excréteurs permanents chez lesquels le virus continue à se multiplier ; ce fait, s'il était confirmé, pourrait être expliqué à la lumière des dernières théories sur l'origine des virus : le métabolisme de certaines cellules de prédilection serait dévié et continuerait à fabriquer des [illegible] pathogènes au lieu de ses propres éléments [illegible].

Modes de contagion :

La contagion est subtile. Les malades, les porteurs et les excréteurs de virus contaminent les animaux sains par contact [illegible] abattoirs, expositions. La salive, les déjections... souillent les aliments, boissons, [illegible] animaux domestiques et [illegible] oiseaux, rongeurs, véhicules, routes... La transmission par les [illegible] Les [illegible] de virus peuvent porter la contagion à des distances considérables. Le froid, la neige, la glace, le temps sec, favorisent la conservation du virus, contrairement à l'humidité.

L'homme pourrait avoir une maladie inapparente du type de celles décrites par Charles NICOLLE et être ainsi contagieux à son insu (KLING & HOJER, 1926).

Les produits animaux : carcasses, cuirs, poils, lait et dérivés, les produits alimentaires humains : pommes de terre, conserves peuvent être aussi des agents de dissémination du virus.

La fièvre aphteuse ne se propage pas de façon étrange [illegible] de génération spontanée [illegible] inattendues : présence [illegible] extraits organiques, [illegible] recueillis sur des animaux [illegible] ou trop vieux....

[illegible] teuse paraissent avoir une [illegible] pliquée ou, plutôt, souvent inavouée : l'air ne peut [illegible] mis en cause ([illegible], 1899), les poussières, e[illegible] [illegible] aucun rôle, en prenant des mesures strictes [illegible]

[illegible] (1948) a conservé [illegible] jours, en milieu [illegible]

Afin de montrer la facilité de la contagion de la fièvre aphteuse nous terminerons sur l'exemple cité par [illegible] ([illegible]). En 1879, la fièvre aphteuse éclate dans une localité [illegible] protégée par une double chaîne de postes militaires depuis [illegible] cette protection avait pour but d'empêcher tout trafic afin d'éviter

[illegible] dans la [illegible] d'une [illegible] avait [illegible]. La nuit, les [illegible] ; celle-ci avait [illegible] le lendemain.

b) Caractères biologiques du virus [illegible] :

[illegible] :

Le [illegible] est [illegible], c'est-à-dire qu'il [illegible] propre, différente de celle des autres [illegible] ; il a une affinité élective pour les cellules [illegible] et [illegible] espèces animales et un [illegible] particulier puisque l'organisme, par lui infecté ou vacciné, réagit par la production d'un [illegible] est constante ; les passages répétés sur bovin ne modifient pas ses qualités [illegible], il produit toujours la même [illegible] caractéristique.

Souches de virus : Par souche, on entend un virus [illegible] la pratique [illegible] garde, en principe, et pendant un temps plus ou moins long, ses caractères [illegible] de virulence, d'infectiosité, de pouvoir [illegible], de localisation et [illegible] de culture.

[illegible] son agressivité et [illegible] sont indépendantes les unes [illegible] pas obligatoirement dans le même [illegible] conservation, ou de nombreux passages [illegible] diminuer la virulence sans qu'[illegible]

[illegible] :

[illegible] pouvoir d'un virus de [illegible], ses lésions, sa [illegible] deux facteurs : le pouvoir du [illegible] les cellules animales (objets [illegible] nocivité du virus pour ces cellules [illegible] c'est l'aptitude" -du virus- "à "attaquer et à [illegible] certaines cellules. C'est...... "une fonction [illegible] de nutrition du parasite" (HAUDUROY, 1934).

Le temps d'incubation, la rapidité de la mise... l'importance et le nombre des organes atteints sont [illegible] ...nnels [illegible]

Pour le virus aphteux, la [illegible] ... mais d'une façon [illegible] relative, par le rapport entre le [illegible] ... [illegible] ...est faible, le virus reste localisé à son point d'in[illegible] ... il n'a pas la force de prendre la voie [illegible] et le conduire à la généralisation. Entre chaque couche [illegible] ... et chacune peut être sujette à des variati[illegible] ... [illegible] ... [illegible] des modifications de ses propri[illegible] ... [illegible] les variations de l'activité d'un vi[illegible] ... son origine ; lymphe, paroi d'aphtes, séru[illegible] ... [illegible] de sa culture [illegible] ... elles sont soumises aux réactions de défense [illegible] ... : virus et cellule. Au cours des [illegible] ... dans la nature, ou expérimentaux, la virule[illegible] ... [illegible] ... selon les [illegible] ...ences, la virulence s'accroît pour le Bo[illegible] ... ou vice-versa [illegible] ... les généralisations [illegible] ... cert[illegible] ... [illegible] aphtes de généralisation des bovidés peut [illegible] ... [illegible]

[illegible]

[illegible] tion au [illegible]

[illegible] numération pour les variétés [illegible]

"déterminé par dilution progressive, [illegible]

"animaux [illegible]

"risti [illegible] maladie [illegible]

[illegible] encore [illegible]

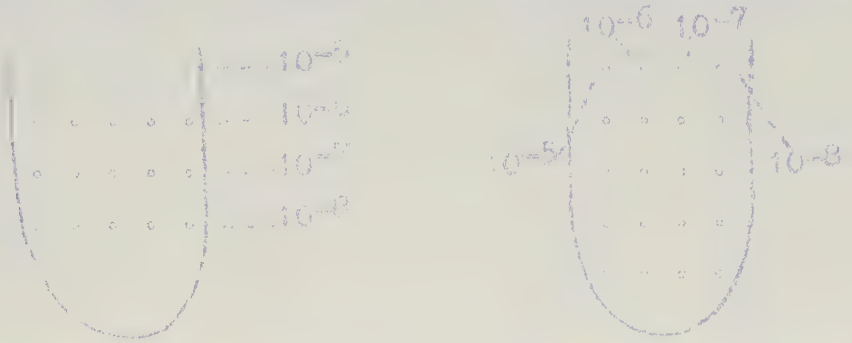
[illegible] grande dilution [illegible] point [illegible] différents [illegible]

doit [illegible]

[illegible] inocula- [illegible]

Le titrage de chaque dilution sur les langues de deux bovins est parfait, mais très onéreux et les observations peu nombreuses. [illegible] un bovin. Pour titrer un virus, HENDERSON se sert de deux bovins réceptifs. Il inocule la suspension dans le derme de la langue sur 4 lignes transversales de 5 points chacune. Chaque ligne reçoit une seule dilution et chaque point 0,1 cc. La dilution la [illegible] 24 heures (une période d'incubation supérieure : 48 h. par exemple, [illegible]) les aphtes de généralisation n'ont plus de sens. Le calcul de L 50 [illegible] (addition des aphtes apparus sur les 10 points de la même dilution et des dilutions inférieures, puis addition des points d'inoculation [illegible] une seule langue.

Pour éviter l'inégale réceptivité de la surface de la langue, nous avons pensé que les lignes d'une même dilution devraient être faites dans le sens longitudinal et non dans le sens horizontal.



Inoculation selon HENDERSON — Inoculation personnelle

Chaque dilution est éprouvée ainsi au niveau de 2 zones particulièrement sensibles : près de la protubérance et de la pointe de la langue. Les injections intradermiques au niveau de la pointe, plus ou moins kératinisée, de la langue sont d'ailleurs plus difficiles à réussir qu'aux autres endroits.

[illegible] plus haut dans les aphtes que dans le sang ou les organes. Les [illegible] souches de $10^{[illegible]}$ (sang défibriné de bovin), $10^{[illegible]}$ (aphtes de [illegible]) $10^{7,8}$ (lymphe de bovins) par comparaison la lymphe [illegible] $10^{6,26}$.

L'activité d'un virus à 10^{-6} est courante, c'est le titre requis par la Commission de la Fièvre Aphteuse à l'Office International des Epizooties pour la préparation du vaccin Vallée-Schmidt-Waldmann. Certains virus "rajeunis" par passages répétés peuvent atteindre des titres de 10^{-8} et même 10^{-9}.

Arbitrairement on a tendance à calculer l'unité infectante en fonction du titre de la suspension, par exemple on dit qu'un cc. d'une dilution à 10^{-4} d'un virus actif à 10^{-8} contient 10.000 unités infectantes.

Le titre d'un virus peut être augmenté par :
- des facteurs biologiques : passages répétés sur animaux très réceptifs, passages sur espèces animales [illegible] FROSCH, 19[illegible] autre germe infectieux ([illegible]), virus aphteux et typhus),
- des facteurs chimiques : phosphates (MICHELSEN, 1947), phosphate de calcium de formule $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (COBBRUGGER, 1951), substance organique de KOBE [illegible] (1938) dans le sang des cobayes immunisés contre la fièvre aphteuse.
- des facteurs physiques : Rayons X (MICHELSEN, 1949).

[illegible]

POUVOIR [illegible]

[illegible] Ce sujet [illegible] est exposé en [illegible]

[illegible]

[illegible] développe [illegible] ; elle doit être [illegible] de [illegible] préférence, en [illegible]. Le virus attaque d'emblée la cellule, [illegible] stimule elle-même à la multiplication. Cette stimulation [illegible] [illegible] : la [illegible] d'une langue de bovin dont [illegible] le [illegible], est remarquablement rapide. A la multiplication cellulaire, un processus de lyse s'associe bientôt : les cellules se gonflent, se vacuolisent, éclatent et forment des vésicules. L'infiltration leucocytaire est secondaire. Les lésions évoluent sans inflammation, suppuration ou nécrose, comme celles provoquées par les microbes visibles (1). La virulence et l'infectuosité sont [illegible] l'affinité cellulaire : si l'affinité diminue, la virulence diminue, mais le contraire n'est pas certain ; par exemple la conservation d'un virus aphteux provoque l'abaissement du titre sans que l'affinité diminue.

Affinité tissulaire :

Le virus aphteux présente un dermotropisme très marqué, il a une affinité essentielle pour les muqueuses externes et internes et pour la peau, d'où sa classification dans les épithélioses (BORREL) ou [illegible] (LEVADITI). Son tropisme pour les épithéliums ectodermiques est particulièrement accusé pour certaines régions électives : muqueuses de la bouche, du rumen, du mufle, des narines, de la [illegible] [illegible], le cerveau, le poumon (origine endodermique) et la r[illegible] (origine mésodermique) sont à peu près constamment virulents, [illegible] [illegible] certaines souches, les aphtes secondaires de généralisation [illegible] avec plus de fréquence à certains des lieux de prédilection : par exemple, chez le cobaye, certaines souches provoquent des lésions de la bouche, contrairement à d'autres. Un même virus peut évoluer au cours de nombreux passages, par exemple : un virus donnant des lésions généralisées à la bouche des cobayes, après quelques passages n'en provoque plus, puis recommence — même exemple : l'ordre d'apparition des lésions secondaires peut varier : les aphtes des membres antérieurs ou de la bouche peuvent [illegible] être avant ceux du membre postérieur non inoculé.

Quel est le motif de ce[illegible] [illegible]sulaire ? Les rares travaux entrepris par les [illegible] n'ont pas résolu le problème : l'absence de [illegible] un critère suffisant puisque sur [illegible] [illegible] peuvent [illegible] les pres[illegible] [illegible] à la formation des aphtes [illegible] [illegible] entièrement déterminé par la [illegible].

---

(1) Il existe [illegible] souvent remarqué : si le virus est associé à des microbes il peut s'en isoler au cours du passage sur un animal sensible. L'injection d'une suspension de virus [illegible] ne provoque jamais d'[illegible] dans la langue d'un bovin (voie intradermique) et rarement dans le [illegible] du cobaye.

Malléabilité du virus aphteux :

L'affinité primitive du virus aphteux -le dermotropisme- peut être modifiée par passages répétés dans le cerveau de la souris ; NAGEL & HOFMANN ont fait acquérir au virus aphteux un neurotropisme, alors qu'il en était son dermotropisme.

Affinité pour certaines espèces animales :

Le virus aphteux affecte naturellement les mammifères artiodactyles. Les porcins, ovins et caprins sont un peu moins sensibles que les bovins. Pour VALLEE, l'inoculation expérimentale des bovidés provoque une fièvre aphteuse toujours plus bénigne que la maladie naturelle. Certaines races bovines ont une réceptivité irrégulière. De nombreux animaux domestiques ou sauvages : chameau, buffle, zébu, renne, lama, girafe, cerf, chevreuil, éléphant, tapir, sanglier, phacochère, hérisson, peuvent être atteints de fièvre aphteuse.

Expérimentalement, le cobaye (1), les lapins domestique et de garenne, le rat, le hamster et le furet sont réceptifs ; le chien, le chat, la souris, n'ont [illegible] les oiseaux résistent au virus aphteux. La réceptivité des singes est discutée : les singes inférieurs seraient réceptifs (CEZARESCU, 1925), une infection latente a été réalisée chez Cercocebus fuliginosus (KLING & [illegible] par FRENKEL & VAN CAVEREN (1938). La transmission [illegible] (1932), KALLMANN (1936), RINJARD, GRATICLET & CHABROT (1939), MAGNUSSON (1939), mais elle est très rare, surtout si l'on considère la fréquence des contacts entre les animaux atteints et l'homme, au cours des épizooties et dans les laboratoires. Des cas de stomatite humaine sont souvent rattachés, cliniquement, à la fièvre aphteuse [illegible] identifiés, les malades présentaient des aphtes au niveau de la bouche et des doigts.

Adaptation : Certaines souches de virus peuvent s'adapter, au cours des épizooties, à certaines espèces animales, parfois le virus du bovin ne se transm[illegible]

---

(1) Il est souhaitable d'expérimenter sur les bovins, réceptifs, sensibles et précis, mais on est obligé, pour des raisons économiques, d'avoir recours aux cobayes, seule espèce de laboratoire qui puisse donner satisfaction. Il y a intérêt à prendre des cobayes dont le coussinet plantaire n'est pas pigmenté, les aphtes sont beaucoup plus visibles.

pas aux autres animaux. Inversement, de nombreuses souches adaptées naturellement au [illegible] perdent toute virulence pour les bovins ([illegible], 19[illegible]; [illegible], 1950). Il est bien connu que les souches adaptées au cobaye reprennent difficilement leur virulence pour le boeuf.

Affinité au terrain (épidémiologie).

Aucun pays, sauf l'Australie et la Nouvelle-Zélande, n'a échappé à la fièvre aphteuse. Autrefois la maladie arrivait, par vagues, de l'Orient et envahissait l'Europe en quelques années, frappant la plupart des animaux réceptifs. Puis elle disparaissait, comme si tous les animaux étaient immunisés, pour réapparaître, sans cause [illegible], une dizaine d'années plus tard. La fièvre aphteuse n'a plus cette périodicité si marquée. La maladie prend une allure enzootique dans ses foyers, [illegible] épizooties; celles-ci arrivent tous les [illegible] ans, par exemple 1911, 1914, 1915, 1920, 1926, 1938 (Allemagne). [illegible] Il semble que le virus [illegible] sur des animaux très réceptifs, [illegible], par la suite, ses conditions [illegible], d'où [illegible] l'apparition des variantes de types. Cette "défense" du virus semble [illegible] (sur un fond [illegible]) [illegible], puisque les trois types et [illegible] variantes sont en cause en France: C_2, A_4, A_5, C. Il semble depuis l'extension des vaccinations, que le virus cherche à lutter contre les vaccins en multipliant ses variantes, en devenant "[illegible]" [illegible] Professeur RAMON, Directeur de l'Office International des Epizooties, [illegible] la gravité de l'épizootie actuelle qui est signalée dans toute l'Europe, en plusieurs pays d'Amérique du Sud, au [illegible].

[illegible] réceptivité [illegible] de diffusion

[illegible]

pouvoir [illegible], [illegible] devient rapidement [illegible]. [illegible] virus augmente [illegible] ne sont pas toujours [illegible]. [illegible] de 1937 était peu [illegible] mais d'un grand pouvoir d'extension; au contraire, celui de l'épizootie de [illegible], en 1942, était très [illegible] ([illegible] de mortalité) mais peu diffusant. Ces variations, [illegible] courante, ont des origines inconnues [illegible] peuvent tenir à des influences diverses : modification de réceptivité des animaux, diminution de l'immunité des animaux ou mutations des virus. Les influences [illegible] ques sont purement hypothétiques, [illegible] (1948) n'a pu déterminer l'action des influences météorologiques [illegible] complexes. L'extension des épizooties ne semble pas avoir de rapport avec le climat ou les saisons. Il est certain, toutefois, que le froid prolonge la période d'incubation de la fièvre aphteuse expérimentale du [illegible], il retarde l'éruption aphteuse et peut empêcher la généralisation ([illegible], 1934) ; la chaleur, au contraire, raccourcit la période d'incubation et aggrave l'[illegible]tion ([illegible], 1930).

On connaît quelques facteurs, inhérents [illegible] d'entretien. Les [illegible], les plus [illegible] sont les plus [illegible] observation a été confi[illegible] [illegible] les ovins (Indes), [illegible] rets, les [illegible] les infections sont moins graves [illegible] lorsque les animaux sont [illegible] ou affaiblis par [illegible] infections [illegible] (salmonelloses) ou parasitaires [illegible] susceptibilité augmente si l'alimentation est [illegible] et améliorée. Les animaux bien [illegible] les nucléo-prot[illegible] nécessaires [illegible].

[illegible]

[illegible], l'intensité de la mas[illegible] d'ailleurs variable selon les animaux d'un même troupeau. Les mâles auraient une sensibilité plus grande à la fièvre aphteuse. Le rôle de la réceptivité individuelle est certain.

Le caractère biologique fondamental du virus aphteux [illegible] variabilité de son pouvoir pathogène dans toutes [illegible] mais les causes de cette variabilité [illegible].

Pouvoir immunisant :

Les animaux guéris de fièvre aphteuse sont immunisés, pendant un temps variable, contre une nouvelle atteinte. La durée de l'immunité est, en moyenne, d'un an. elle peut être très courte, 40 à 90 jours, ou très longue, 5 et même 7 ans. L'immunité est solide dès la fin de la maladie. elle ne peut être rompue, ni par contact avec des malades, ni par inoculation expérimentale.

L'immunité est tissulaire et humorale. L'immunité tissulaire (immunité locale) s'établit dès l'éruption des vésicules puisque, dès ce moment, les essais de réinfection échouent; elle est de courte durée. Au point de vue de l'immunité humorale le virus aphteux se comporte comme un antigène : lorsqu'il est injecté in vivo, il provoque l'apparition d'anticorps décelables, dans le sérum, 3 à 4 jours après le début de la maladie naturelle (7 à 8 jours après une inoculation); le taux des anticorps atteint son maximum 15 à 21 jours après le début de l'infection aphteuse. La présence des anticorps ne peut être décelée que pendant un temps déterminé, variable selon les sujets, en moyenne 2 à 3 mois ; ensuite on ne peut plus les mettre en évidence malgré la persistance de l'état réfractaire. Les anticorps n'existent pas dans les milieux organiques naturellement [illegible] (liquide céphalo-rachidien, humeur aqueuse). Le sérum anti-virus aphteux a des propriétés neutralisantes in vivo ; s'il est injecté simultanément ou, mieux, avant une inoculation virulente, il protège [illegible] l'animal pendant 15 jours environ. Il n'est pas d'une qualité remarquable, les doses préventives doivent être assez élevées : 1 à 2 cc. par kilo de poids vif chez les bovins, 1 à 5 cc. par kilo pour les cobayes. Nous verrons qu'il est possible d'augmenter le taux des anticorps, c'est-à-dire d'améliorer le titre du sérum, par l'hyperimmunisation, autrement dit en répétant les injections de virus chez un animal guéri. Le pouvoir neutralisant in vitro (inactivation du virus par son mélange in vitro avec le sérum [illegible]) [illegible], mais varie avec les sérums. VALLÉE & CARRÉ (1924) ont montré que la sensibilisation du virus [illegible], par le sérum [illegible], ne neutralisait pas l'activité du virus si le mélange est injecté par voie intradermique, mais la détruit [illegible], sans immunité secondaire, si le mélange est injecté par voie [illegible] intraveineuse. Depuis quelques années, on a [illegible] les qualités [illegible] sensibilisatrices du sérum [illegible], rendant possible la déviation du complément.

L'existence des propriétés [illegible] et précipitantes du sérum anti-aphteux n'est pas prouvée.

L'intensité de l'immunité est variable : elle dépend de la gravité de la maladie, du pouvoir [illegible] du virus, de la réceptivité et de la réaction de l'animal. [illegible] d'un sujet n'est pas [illegible] de l'établissement de l'immunité.

[illegible]

[illegible] hyperimmuniser, [illegible] le rendre, on ne sait [illegible] hypersensible; [illegible] phénomène, rare [illegible] mis en évidence par [illegible], puis VALLEE.

De tout temps, on a observé des ré[illegible] de fièvre aphteuse [illegible] plusieurs fois [illegible] quelques semaines d'intervalle. VALLEE & CARRE ont expliqué ce paradoxe en découvrant la notion de la pluralité du virus aphteux.

Pluralité du virus aphteux :

Cette découverte de VALLEE & CARRE est capitale, [illegible] seulement au point de vue théorique, mais encore au point [illegible] d'employer efficacement les sérums et les vaccins au cours des épizooties.

VALLEE & CARRE ont démontré que le virus aphteux [illegible] il existe des races, ou types de virus, différents. Si la maladie, les symptômes, les lésions que les types provoquent, [illegible] leurs modes de contagion pour les espèces sensibles et leurs propriétés générales sont sensiblement les mêmes, ils diffèrent profondément quant à l'immunité qu'ils confèrent : cette immunité est étroitement spécifique de chaque type de virus.

VALLEE & CARRE ont distingué deux types qu'ils ont dénommés : O (du département de l'Oise, virus procuré par le Docteur-Vétérinaire QUENTIN) et A (du département des [illegible] Vétérinaire Général [illegible], et provenant de bovins de récupération de Prusse Orientale. WALDMANN & TRAUTWEIN (1926) confirment les travaux de VALLEE & CARRE et découvrent un [illegible] type : C. Il est [illegible]
à Vallée. [illegible]

[illegible] sur bovins, ou plus [illegible] peu, la méthode [illegible] de différencier les [illegible] par le virus [illegible] il est réceptif [illegible] C, et [illegible] ement par O et A [illegible] 2 types virulents, [illegible] rigoureusement spécifique, [illegible] à un autre ; TRAUTWEIN a [illegible]

Le type O est le plus commun ; le type C est rare. La recherche des caractères différentiels des types, au point de vue des dimensions des corpuscules [illegible], des différences de temps de conservation des virus virulents (... plus fragile que O) et de la [illegible] n'est pas démonstrative.

Le problème de la pluralité des virus aphteux n'est pas aussi simple, le cadre des trois types est débordé. Les 3 types paraissent stables malgré l'opinion non confirmée de [illegible]INGER qui pense que le type [illegible] et que les types A et C ne sont que des [illegible] du type O. Mais il existe des souches de virus que l'on ne peut classer dans les 3 types et qui présentent des caractères antigéniques communs à 2 types ([illegible]). Certaines souches [illegible] à un type unique (souvent O) après quelques passages sur animaux.

D'après ANDREWS ([illegible]) la structure antigénique des virus est complexe, surtout celle des souches isolées sur le terrain. L'un des types l'emporte sur les autres et s'affirme lors des passages expérimentaux. Par passages [illegible] le cobaye, ECCLES [illegible] une souche de virus tout d'abord de type [illegible] antigéniquement [illegible].

[illegible]

[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

[illegible]

[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

[illegible]

décrit [illegible]

[illegible]

[illegible] vis-à-vis de l'antigène [illegible] qu'aux faibles dilutions [illegible] positive pour toutes les variantes, [illegible] différencie au fur et à mesure des dilutions, [illegible] à TRAUB (1949) :

Sérum	Dilution du sérum	A_1	Antigène A_2	A_3
A_1	[illegible]	++++	++	++
	[illegible]	+++	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	++	—	—
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
A_2	[illegible]	(+)	++++	(+)
	[illegible]	[illegible]	+	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	—	—
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
A_3	[illegible]	[illegible]	[illegible]	++++
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	++++
	[illegible]	[illegible]	—	—
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	—

(le nombre de + indique l'intensité de la réaction).

[illegible] (1950) considère que les variantes A_1, A_2, A_3, A_4 ne rompent qu'irrégulièrement l'immunité acquise par une atteinte naturelle du type A, malgré les différences sérologiques incontestables.

En cas de mélange de types, le virus [illegible] est capable de se superposer aux virus A et C, probablement en raison de sa multiplication plus rapide et plus active ([illegible] & [illegible], 1950), [illegible] (1951) poussent l'expéri- [illegible] ment : [illegible] peut supplanter A et C, mais [illegible] et C peuvent être supplantés par A_4.

[illegible]

c) Diagnostic :

Identification du virus aphteux, de ses types, de ses variantes :

Le diagnostic clinique est facile ; il est déjà orienté par l'allure contagieuse de la maladie [illegible] des aphtes dans les lieux de prédilection est un signe pathognomonique. L'inoculation expérimentale de produits virulents lève les doutes, elle [illegible] entreprendre pour assurer un diagnostic différentiel avec diverses maladies : stomatite vésiculeuse (virus transmissible au Boeuf, au Cheval, au Porc et au Cobaye), l'exanthème vésiculeux du porc (virus non transmissible au Bovin et au Cobaye) [illegible] (virus provoquant des lésions pseudo-diphtériques) [illegible] les muqueuses, principalement vaginale et intestinale [illegible] (les papules sont bordées d'un [illegible] des aphtes de la fièvre aphteuse).

[illegible] est facile : par acidification à pH 2,75 et réalcalination, le virus aphteux est tué, [illegible] [illegible] [illegible]. Les [illegible] [illegible] des virus aphteux et de la stomatite vésiculeuse (BURNET & GALLOWAY, 1934 - REPPIN & PYL, 1934). [illegible] que le virus de la stomatite atteint 70 à 100 mμ.

Le diagnostic allergique a été tenté par SARNOVIEC (1934). L'inoculation intradermique de 1/10 cc. du broyage d'épithélium d' [illegible] donne une réaction plus ou moins [illegible]

[illegible] des variantes peut se faire par des épreuves d'immunité croisée sur bovins et également chez le Cobaye, après adaptation des souches bovines [illegible] sérum d'animaux guéris, elles peuvent être réalisées par plusieurs méthodes :

- [illegible] la rupture des aphtes
- inoculation des aphtes à identifier à des animaux guéris respectivement des virus O, A ou C (ou à des animaux [illegible])
- inoculation des aphtes à identifier à des animaux réceptifs puis, après guérison, inoculation des virus de collection,
- injections simultanées des sérums de collection et de virus à identifier à des animaux réceptifs,
- épreuve de neutralisation, en laissant en contact, pendant [illegible]

de collection et en inoculant le mélange dans la langue des bovins (BROOKSBY, 1949).

- préparation de sérum anti-virus inconnu (animaux de la 2ème série) et titrage vis-à-vis des virus de collection.

- à partir de sérum (prélèvement 15 à 21 jours après la maladie) :

  - inoculation simultanée des sérums à identifier et des virus de collection, à des animaux neufs.

Les réponses de ces diverses épreuves ne sont pas toujours très régulières, étant données les réceptivités individuelles (surtout des cobayes), les variations de virulence des virus, l'adaptation parfois difficile au Cobaye. Depuis 1929, CIUCA a démontré l'existence d'anticorps spécifiques fixant le complément. TRAUB & MOEHLMANN (1943), puis UBERTINI (1947), ARAMBURU (1949)... ont codifié cette méthode qui permet de faire, facilement, l'identification des types et des variantes. Toutefois, certaines souches ont un pouvoir anticomplémentaire qui empêche la lecture. La meilleure méthode consiste à mettre en présence un antigène d'origine bovine et des sérums hyperimmunisés préparés sur cobayes. Il est nécessaire d'avoir 2 gr. d'antigène frais pour chaque déviation, ce qui oblige pratiquement à inoculer un bovin avec les aphtes reçus du terrain. Les cobayes producteurs de sérum doivent peser au moins 500 à 1.000 g après guérison de la fièvre aphteuse ils doivent recevoir deux fois, à huit jours d'intervalle, par voie intraveineuse, le broyage d'un aphte de cobaye. Chaque sérum doit être titré car la quantité d'anticorps est sujette à de grandes variations. Par la dilution des sérums on peut identifier les variantes. Le diagnostic est rapide, 48 h. environ : 24 h. pour le passage sur un bovin, 24 h. pour la préparation de l'antigène. L'antigène déviant le complément serait différent de l'antigène immunisant, l'antigène de fixation du complément peut être séparé du composé infectant par ultracentrifugation du virus (BACHRACH, 1951). Le parallélisme entre la quantité d'antigène déviant et la quantité de virus dans l'épithélium d'aphtes n'est pas prouvé (MOEHLMANN & PEHL, 1950).

L'agglutination de diverses particules (collodion, kaolin, hématies, charbon, hydroxyde d'aluminium) est possible mais n'est spécifique ni du virus, ni du type (FRENKEL, 1938). MICHELSEN (1949) a réalisé l'hémo-agglutination des hématies de rat avec du sérum immun

[illegible] bovin à [illegible] h. La réaction est spécifique si un contact préalable sérum et hématies de [illegible] fait 12 h. avant la réaction. Le taux du sérum est de 1/[illegible] à 1/[illegible]. L'addition de sérum homologue au virus inhibe l'agglutination alors qu'un sérum hétérologue n'inhibe que les dilutions les plus élevées de virus. Ces travaux sont encourageants mais limités par les propriétés inhibitrices non spécifiques des sérums.

Une nouvelle méthode de diagnostic a été préconisée par [illegible] elle est basée sur l'addition de sérum neutralisant du type [illegible] à ses cultures du virus [illegible]. L'examen histologique permet de déceler des lésions [illegible] dans les tissus de culture ne contenant pas le sérum homologue. De plus, seules les cultures sans sérum homologue injectées dans la langue de bovins, déterminent des aphtes.

d) Conservation du virus aphteux :

Le virus aphteux est relativement résistant (d'autant plus s'il est [illegible] il s'est multiplié) aux agents physiques et chimiques, il l'est également dans les conditions naturelles [illegible] il est dispensé largement par les animaux infectés, et dans les conditions expérimentales si ses quelques exigences sont satisfaites.

Dans la nature :

[illegible] actif plus [illegible] dans l'eau et l'eau de mer. BURBURY (192[illegible]) a prouvé qu'il [illegible] différentes matières alimentaires (foin, son, sucres, pommes de terre), [illegible] papier, bois, sacs, linges...). VALLEE [illegible] le virus se conserve 8 mois dans les petites [illegible] des Alpes, puisque les animaux contractent [illegible] tant à l'alpage au printemps, [illegible] été atteints) avaient quitté les étab[illegible] des pâturages, le virus peut se conse[illegible] jours en hiver, mais seulement 3 jours au soleil d'[illegible].

[illegible] le lait, le virus conserve sa virulence 20 h., mais [illegible]

[illegible] jours [illegible] antique [illegible]

[illegible]

Expérimentalement, la période de survie, à 2°, du virus [illegible] avec les différents organes : sang (36 jours), coeur (62 j.), langue et graisse [illegible] ([illegible] j.), [illegible]

Les peaux sont dangereuses, parfois pendant 46 j., malgré les salaisons ; celles-ci n'ont d'ailleurs aucune [illegible] qui reste virulent pendant plus d'un mois (Commission anglaise, 1926).

Le virus aphteux peut survivre très longtemps à la putréfaction dans les eaux résiduaires des abattoirs, les lambeaux d'aphtes y restent pathogènes pendant 21 jours en été et 105 jours en hiver ; dans les fosses à purin le virus peut résister 38 jours. A la surface des tas de fumier le virus [illegible] mais dans la profondeur [illegible] ([illegible], 1939, WAGENER, 1927). La désinfection des fumiers n'est donc pas nécessaire si on prend soin de les remuer et de les retourner en enfonçant celui de la surface, assure VALLEE (1929) en se basant sur son expérience au Laboratoire de Recherches d'Alfort.

Au laboratoire :

Nous avons déjà vu au chapitre des propriétés physiques et chimiques [illegible] et encore mieux desséché sous vide après congélation.

La conservation peut se faire, dans toutes les conditions, entre autres de transport, et à quelle température [illegible] la Commission anglaise, modifié par [illegible] RINJARD

[illegible] cristallisé	4,5 gr.
[illegible]	0,9 gr.
[illegible]	1,16 gr.
[illegible]	[illegible]

[illegible] pure neu- [illegible] le pH à [illegible] de rouge [illegible] eau distillée) ; la solution est stérilisée à l'autoclave, 1/2 h. à 120°, le pH est alors réajusté stérilement, il doit être vérifié, de temps en temps, car il a tendance à s'acidifier. La survie du virus est meilleure si les prélèvements sont placés aux environs de 0°

Un simple milieu de conservation fait d'eau distillée et de glycérine pure neutre donne de bons résultats dans les mains de MOTTGAERT & QUIROGA (1928). BLANC (1949) préfère, pour ce milieu, l'eau de conduite à l'eau distillée.

Les autres milieux préconisés, à base de chlorure de sodium concentré à 25 p. 100 additionné de blanc d'oeuf, ne sont pas meilleurs. Les milieux glycérinés ont l'avantage de stériliser bactériologiquement les produits souillés.

Le sang défibriné aphteux conserve son activité pendant plus de 6 mois s'il est placé entre -1° et +2° en ampoules scellées ou en flacons bouchés au caoutchouc. Les souillures accidentelles n'influent pas sur la conservation du virus (ROUX, VALLÉE, CARRÉ & NOCARD, 1921).

e) Lutte contre le virus aphteux :

La lutte peut tendre à guérir les animaux (traitement), à rendre les animaux réfractaires à la maladie (prophylaxie médicale), ou à éviter la contagion (prophylaxie sanitaire).

Cette étude, d'une importance capitale, sort du cadre de notre travail, aussi nous n'en donnerons qu'un schéma pour fixer les idées et situer l'intérêt de la culture du virus.

Traitement :

Le traitement spécifique n'existe pas. Toutes les substances chimiques thérapeutiques ont été essayées sans succès. Les sulfamides, l'auréomycine [illegible] et certains antihistaminiques, d'après des expériences [illegible], retardent l'apparition des lésions secondaires chez le cobaye.

L'auto-hémothérapie ([illegible]) (le sang étant prélevé au moment de l'élévation thermique) a une action très discutée. L'hémothérapie, la sérothérapie, la galactothérapie, ont peu de propriétés curatives, mais rendent l'évolution moins grave ; les doses sont, en moyenne, de 40 cc. pour 100 K. de poids vif.

Il est bon de savoir qu'au cours des épizooties apparaissent un très grand nombre de remèdes plus ou moins secrets et spécifiques (700 au moins en Allemagne de 1937 à 1950) ; ils n'ont aucune valeur, comme les essais expérimentaux le prouvent, mais enrichissent, temporairement, les trafiquants.

Le traitement symptomatique doit être entrepris pour éviter les complications et soutenir l'état général des malades. Les injections d'anatoxine staphylococcique préviennent l'apparition des mammites ([illegible], 1950), les injections de prolan combattent les complications ovariennes ([illegible], 1939), le sérum anti-réticulo-endothélial cytotoxique aurait ses indications ([illegible], 1950).

[illegible] ce qui ne laisse que [illegible] surtout de rendre les animaux réfractaires à [illegible] l'apparition de la fièvre aphteuse : c'est le rôle de la prophylaxie.

Prophylaxie médicale :

Immunisation active :

Elle est réalisée par l'organisme lui-même lorsqu'il reçoit du virus actif ou atténué ; jusqu'à [illegible] une immunité appréciable.

Inoculation virulente ou aphtisation :

C'est donner la maladie avec ses dangers. Cette méthode pratiquée depuis [illegible] (1810) fut longtemps utilisée ; ROSSIGNOL (vétérinaire à Melun, dans la ferme duquel PASTEUR fit ses célèbres expériences sur le charbon bactéridien à Pouilly-le-Fort) la préconise encore en 1888. Avec un linge imbibé de salive virulente on frottait la bouche des animaux encore indemnes d'une ferme et on espérait, souvent à tort, que l'évolution serait bénigne.

Divers artifices pour atténuer le résultat de l'[illegible] bénignes et régulières : inoculation par voies sous-[illegible] ROUSSU, de [illegible] et [illegible] ou intramusculaire ([illegible], 1939, application à 7 millions de bovins de la Rhodésie) emploi, au lieu de lymphe ou [illegible], de sang ou de sérum virulent ([illegible], [illegible], ROUSSU, VALLEE), de sang défibriné (ROUSSEAU) ou citraté (ROUSSU), d'hématies virulentes ([illegible]), de virus de culture ([illegible] & VAN WAVEREN).

Cette méthode qui ne doit jamais être appliquée dans les exploitations indemnes devrait être proscrite en raison de ses dangers.

Inoculation de virus atténué :

Les pouvoirs pathogène et immunisant du virus aphteux peuvent être séparés par différents moyens. Cette dualité des pouvoirs rend possible la préparation de vaccins efficaces.

[illegible]

[illegible]

- [illegible]ssement (sang conservé un mois au frigorifique, [illegible], LIGNIERES),
- [illegible], aphtes dilués (PERRONCITO, VALLEE, LIGNIERES
- [illegible] dilué et laqué (VALLEE & CARRE),
- [illegible], lymphe chauffée à 60° (LOEFFLER), 5 jours à [illegible],
- [illegible]sication, sang desséché ([illegible]),
- [illegible]bement, dans l'huile de vaseline et la terre d'infusoires ([illegible]),
- rayons ultraviolets, l'irradiation U.V. sur le virus [illegible] mine-protéine (HANSEN & [illegible]) donne de grands espoirs ; [illegible] physiques du virus aphteux (p. 50).
- adsorption sur hématies de bovins guéris ou sur hématies sensibilisées par du sérum antiaphteux (LOEFFLER, VALLEE & CARRE).

Atténuation par les moyens chimiques :

- Formol : VALLEE, CARRE & RINJARD (1925) ajoutent 2 p. 1.000 [illegible] 48 jours à 4 mois. Les tissus de cobayes infectés peuvent être utilisés comme source virulente (2 p. 1.000 de formol, 48 h. à 20°, 50 cc. par bovin). La voie intradermique (2 cc.) a été [illegible]

[illegible] à 1,5 p. 1.000 le broyage [illegible] aphtes et vaccinent ainsi les cobayes et les bovins (6 à 12 [illegible] formolés peuvent [illegible]

[illegible] 1.000), conservé 48 h. à [illegible] par bovin) ne provoque [illegible]

- L'iode ([illegible]), le phénol (2 p. 100 à pH 7,4), le [illegible] de soude ([illegible]), l'eau oxygénée ([illegible]), la [illegible] saponine, donnent [illegible]

- [illegible], 1'[illegible] est [illegible] jours [illegible] mélange d'[illegible], après une conservation de 10 jours, le mélange n'est [illegible] virulent. La [illegible] du Cobaye a été [illegible] par voie intra-dermique (GALEA) comme celle du Bovin [illegible] injections sous-cutanées de 1 cc. puis 5 cc., à 8 jours d'intervalle [illegible]), mais l'immunité est de courte [illegible].

Cristal violet : GRAUB, ZSCHOKKE & SAXER préparent un vaccin à base de sang virulent défibriné, filtré, traité par le cristal violet (50 cc. à 1 p. 100 pour 1 litre de sang, et chauffé 10 jours à 38° — 10 cc. pour un bovin). Les résultats sont discutés.

Atténuation par les moyens biologiques :

- virus sensibilisé par du sérum antiaphteux (VALLÉE)
- virus de passages sur le porcelet (LOEFFLER, STAZZI)
- virus de passages sur le cobaye (WALDMANN & TRAUTWEIN, LIMINGER)
- virus cultivé en même temps qu'un autre virus : vaccine (BELIN, 1927, cf. formule des vaccins aphteux voir p. 156), clavelée (DELPON, RINJARD & CORDIER, p. 156)
- par phénomène d'interférence : inoculation simultanée de virus vaccinal et de virus aphteux (HYPPENREITER, GIMMELREICH & [illegible]).

Atténuation par moyens mixtes :

- adsorption sur hydroxyde d'aluminium et atténuation par le formol (SCHMIDT & HANSEN, 1936), l'immunité est [illegible].
- adsorption sur hydroxyde d'aluminium et atténuation par la chaleur (SCHMIDT 1936 : 60 [illegible] p. 100 de suspension d'alumine et 1 à 2 p. 100 de virus, chauffage à 37° pendant 48 h., voie sous-cutanée). SCHMIDT, SCHMIDT-JANSEN, TOGERSEN, FOGEDBY & HAGGO (1938) : formule précédente mais chauffage 72 h. à 37°, pH 7,5, mais sans solution tampon, 12 ctgrs. d'épithélium par dose et par type de virus.
- adsorption sur hydroxyde d'aluminium, atténuation par le formol et la chaleur : vaccin WALDMANN & KOBE, actuellement appelé vaccin VALLÉE-SCHMIDT-WALDMANN puisqu'il résulte des découvertes de ces trois auteurs. Le virus, dans le vaccin, est vivant mais inactivé (RAMON, BASSET, GIRARD ...). Il est préparé à partir d'aphtes de bovins (p. 199), 30 ctgrs. par dose : 15 ctgrs. de virus d'un type et 15 ctgrs. d'un autre type, adsorbés sur hydroxyde d'aluminium, formolés à 0,5 p. 1.000, tamponnés à pH 9 et chauffés 48 h. à 25°. Sa préparation est délicate et la production de

[illegible]
[illegible] par vous-mêmes, dans [illegible]
[illegible] son efficacité est prouvée sur des [illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible] LABOT (1945) a relevé que si ces animaux [illegible]
[illegible] sont éprouvés avec les deux virus [illegible]
[illegible] toujours à la seconde.

[illegible]

[illegible] devenir infectant s'il [illegible] ou s'il est conservé depuis trop [illegible]

[illegible]

[illegible] guérir [illegible]
[illegible] contre-indiqué [illegible]

[illegible]

[illegible] par l'argent [illegible] [illegible] [illegible] suspension de [illegible] (GIRARD & MACKOWIAK),

[illegible] à 15 jours d'intervalle [illegible] injection de rappel au 6ème mois (GIRARD & MACKOWIAK),

– à la voie d'introduction : intradermique [illegible] 2 cc. bovins, 1 cc. moutons),

– à l'augmentation du pouvoir adsorbant de l'alumine (ALTARA & SERRA)

– au remplacement de [illegible] d'alumine par la bentonite (SCHAFFER).

[illegible] formalisation [illegible] par rayons ultra-violets. Le mélange de 5 gr. de virus, 50 cc. d'hydroxyde d'aluminium et 55 cc. d'eau distillée stérile, irradié 80 à 160 secondes, donne des résultats encourageants (TODD),

– adsorption sur charbon d'os, phosphate tricalcique ou précipité glucocalcique phosphaté ; Melle CORDIER a vacciné, avec succès, les moutons par 2 injections, à 9 jours d'intervalle, de 2 cc. de virus à 1 p. 100 et [illegible] 1.000 de formol) ; les essais préalables sur le [illegible] sont favorables,

– mélange de lanoline, huile de vaseline et diéthyl-thiocarbonate de soude (GIRARD & Melle CORDIER) ce vaccin se montre, expérimentalement, aussi efficace chez les bovins que le vaccin Vallée-Schmidt-Waldmann [illegible] dans leurs expériences de contrôle, chez les animaux vaccinés à l'aide des vaccins à base d'hydroxyde d'aluminium ; le cobaye répond bien mieux au vaccin de [illegible]

[illegible] suspension de [illegible] ce vaccin n'est pas assez atténué,

– précipitation chimique, le virus aphteux rendu insoluble par précipitation à -10° par un mélange glycérine-alcool-éther (JANSSEN) immunise les cobayes par voie [illegible] intradermique. Fait curieux : des cobayes vaccinés contre le virus O ont immunisés contre le virus A et inversement. Les [illegible]

culture intratumorale formolée et chauffée (BRIDRE, [illegible] & RINJARD). Le [illegible] est une suspension à [illegible] broyé, formolé à 5 [illegible] 7 jours ; la vaccination [illegible] est encourageante.

- salive virulente et thymol ([illegible]), le vaccin s'emploie à la dose de 5 cc. par voie sous-cutanée et 2 cc. par voie intradermique ; il se conserve 3 mois à 20°.

De tous ces vaccins préconisés, seuls ceux dérivés du type VALLEE-SCHMIDT-WALDMANN sont pratiquement retenus.

Un vaccin idéal doit être d'une innocuité absolue, avoir une efficacité d'une durée de plusieurs mois et une conservation longue et facile. Il doit être dirigé contre chaque type de virus et même de variante. Les vaccins doivent être éprouvés sur bovins, de préférence aux cobayes. La recherche des anticorps du 15ème au 21ème jour après la vaccination donne des indications utiles, mais non absolues.

La découverte du vaccin adsorbé sur alumine a démontré que la formation d'un aphte, ou une élévation thermique, n'était pas indispensable à l'établissement d'une immunité solide, comme on le croyait autrefois.

A l'épreuve de la vaccination, la suspension virulente doit contenir environ 10.000 U.I. (par exemple 1 cc. (ou 1/10 cc. selon GIRARD) d'une dilution à 10^{-4} d'un virus titrant 10^{-8}). Par voie intradermique, sur la langue, le virus ne doit provoquer, si le vaccin est bon, que la formation d'un aphte primaire, au maximum. Il ne doit pas apparaître d'aphtes de généralisation. SCHMIDT a codifié l'étendue des lésions sur la langue par un nombre, plus ou moins grand, de croix.

Immunisation passive :

L'immunité est donnée, à l'animal, par l'apport d'anticorps, l'effet est immédiat mais de courte durée : 10 à 15 jours. Les anticorps peuvent être fournis par le sérum de bovins hyperimmunisés ou par le sang, le sérum ou le plasma d'animaux guéris depuis 12 à 21 jours. Le mélange des sangs de plusieurs animaux est recommandé car le taux des anticorps est variable avec chacun.

Sérums hyperimmuns :

A la suite de KITT ([illegible]), de [illegible] ([illegible]) qui avaient mis en évidence des anticorps dans des sangs de bovins 3 semaines après leur atteinte de fièvre aphteuse, LOEFFLER, FROSCH & UHLENHUTH (1898 à 1902) ont traité des chevaux avec des doses croissantes de lymphe et sont parvenus à obtenir un sérum qui immunise bien le porc et le mouton, mais non le boeuf. C'est par l'inoculation intraveineuse de grandes quantités de lymphe à des bovins qu'ils sont parvenus à obtenir un sérum assez actif sur les bovins. [illegible] (1903) confirme les travaux de LOEFFLER et publie les bons résultats de la séroprévention (premier travail du Laboratoire de Recherches Vétérinaires), mais en montre les inconvénients : difficulté de préparation du sérum en grande quantité, doses élevées.

Par la suite, on a préparé, surtout à Riems, des sérums par

bovins, titrés sur cobayes (0,4 cc. de sérum doit protéger le cobaye contre la généralisation aphteuse). Ces sérums ont l'avantage d'être toujours comparables à eux-mêmes et polyvalents (O,A,C). La dose à utiliser est [illegible] à protéger. [illegible] la préparation du sérum et la purification de ses protéines, [illegible] (1950) les a concentrées. [illegible] attribuent des propriétés toxiques aux sérums de bovins relevant de fièvre aphteuse, mais on sait que le sérum de bovin est naturellement toxique.

Les virus de culture (FRENKEL, BARDACH) sont aptes à la production des sérums. MERIEUX et ses collaborateurs obtiennent un sérum antiaphteux (actif à 0,5 cc.) par l'hyperimmunisation du Bovin par le vaccin Vallée-Schmidt-Waldmann, ce qui permet de préparer le sérum sans précaution spéciale, la contagion n'étant pas à [illegible] collaborateurs pré[illegible] chez le cheval, à défaut de bovins, à partir de virus pur et formolé.

Sang, plasma ou sérum d'animaux guéris :

Les injections répétées de virus n'augmentent que d'une façon relative la quantité des anticorps. Ceux-ci sont déjà suffisants chez les animaux guéris depuis 12 à 21 jours ; il suffit de prélever 2 à 4 litres de [illegible] soude), d'ajouter un antiseptique (1 p. 1.000 de sulfate neutre d'oxyquinoléine) ; on réalise ainsi l'hémoprévention, méthode économique et dirigée spécifiquement contre le virus de l'épizootie en cours, elle a été confi[illegible] grand nombre de sangs d'animaux différents contribue à donner un bon taux moyen d'anticorps. Les doses injectées par voie sous-cutanée doivent être de 1,5 à 2, et même 3 cc. [illegible] peut être préparé à partir de ces sangs, du plasma ou du sérum dont l'activité est la même, mais la présentation et la résorption sont meilleures. Le lait des animaux guéris a les mêmes propriétés préventives que le sang, mais à un degré moindre.

Immunisation mixte

Séro-infection et hémo-infection

Elles consistent à aseconter, par une injection de

virus, la durée de l'immunisation donnée par le sérum, ou le sang, immunisant. Ces méthodes sont groupées, par le Professeur VERGE (1943) sous les noms de séro et hémo-infection, pour les différencier de l'hémo-vaccination réalisée avec des vaccins au lieu de virus. L'infection aphteuse devrait être bénigne, puisque faite sous la protection du sérum, or l'expérience prouve que, dans la plupart des cas, c'est la loi du tout ou rien : ou le sérum inhibe l'action du virus et l'immunité est d'une durée très courte, ou le virus vainc l'immunité et la maladie se déclare. Dans les cas favorables l'immunité n'est ni très solide, ni très longue.

L'infection peut être réalisée par différents moyens : contact des animaux adultes sérumisés avec les malades, dans une exploitation infectée ; application ou injection de sérum ou de sang virulent (1 à 10 cc. de sang ou 2 à 5 cc. de sérum virulent par voie sous-cutanée, VALLÉE & CARRÉ) ; inoculation de virus de culture (FRENKEL & VAN WAVEREN).

Le vaccin de LOEFFLER (seraphine, 1898) consistant en un mélange de lymphe aphteuse et de sérum immunisant était injecté par voie intraveineuse ; les résultats étaient irréguliers.

LIGNIÈRES (1932) a imaginé une séro-infection d'un type spécial. Il injecte, dans un territoire localisé, du sérum par les voies intraveineuse et sous-cutanée, à la faveur de cette protection il inocule du virus qui se développe sur place. Les résultats ne sont pas favorables.

Séro-vaccination :

L'injection simultanée de sérum et de vaccin, dans le but de protéger les animaux avant l'établissement de l'immunité dûe au vaccin, ne doit pas être pratiquée, car le sérum injecté, jusqu'à 30 jours avant ou 10 jours après la vaccination, empêche l'effet complet du vaccin. (STRODHOFF, 1938 ; MOEHLMANN, 1941).

Indications des différentes méthodes d'immunisation :

La vaccination, par les vaccins du type Vallée-Schmidt-Waldmann est jusqu'à maintenant, la plus efficace. Elle doit protéger d'une infection si elle est bien dirigée contre les types de virus en cause.

En cas d'apparition d'un foyer d'infection, les malades doivent être abattus et les contaminés immunisés par séro- (ou hémo) prévention ou par séro- (ou hémo) infection. Tout autour, il est conseillé de faire un cordon protecteur sur quelques kilomètres de profondeur dans lequel les animaux indemnes doivent être vaccinés. Dans les pays peu étendus, comme la Suisse, tous les animaux peuvent être vaccinés.

La séro et l'hémo-prévention ont un emploi limité à la protection momentanée de certains animaux : reproducteurs, jeunes, vaches laitières, ou à certaines occasions : transports, concours, foires, marchés... ; elles ne peuvent pas enrayer une grande épizootie, mais elles en limitent la gravité.

Prophylaxie sanitaire :

Elle vise à empêcher l'introduction de la fièvre aphteuse dans un territoire indemne ou à assurer la disparition de la maladie dans un lieu infecté.

Les mesures de protection d'un pays : visites sanitaires, quarantaines, [illegible] des animaux aux frontières...., doivent être mises en oeuvre, mais sont [illegible] présence d'animaux en période d'incubation, porteurs ou excréteurs de germes. Les exemples, tout récents, d'infection du Mexique, du Canada et, mieux encore, de la Grande-Bretagne, le prouvent.

La protection d'une ferme, au cours d'une épizootie, [illegible] de faire [illegible], la séquestration, la désinfection, la séro-prévention, sont les seuls moyens palliatifs.

Dans un territoire déjà infecté, les mesures sanitaires sont obligatoires, puisque la fièvre aphteuse est une des maladies réputées légalement contagieuses dans les espèces bovine, ovine, caprine et porcine (art. 2, loi du 7 Juillet 1933). La déclaration d'in[illegible], est suivie d'un arrêté. L'isolement et la séquestration, dans [illegible]. La circulation, les abatages, les foires, les marchés sont réglementés. L'arrêté est levé 15 jours après la guérison du dernier malade et après désinfection. La viande des animaux abattus et le lait qui supporte l'ébullition peuvent être consommés.

Certains pays préconisent l'abatage précoce des [illegible]. Cette méthode, suivie d'une énergique désinfection, si elle est faite à temps, peut éteindre les premiers foyers [illegible] (Grande-Bretagne, Suisse), mais elle [illegible] pas toujours efficace (Suède, Mexique).

Depuis 1938, la vaccination [illegible] les mesures de police sanitaire, mais l'épizootie européenne actuelle, avec ses nombreuses variétés de virus, [illegible] les animaux (solution de soude caustique à 4 p. 1.000), des étables et [illegible] additionnée de lait de chaux à 5 p. 100).

[illegible]

[illegible] virulence [illegible] (in vitro).

[illegible] idéal [illegible] mettre d'obtenir [illegible], économique et non dangereuse [illegible] en milieu artificiel.

[illegible] réalisation [illegible] in vivo et in vitro [illegible]

Le [illegible] dirent des cultures que in vivo par [illegible] aux travaux parallèles, mais indépendants, [illegible] in vi- [illegible] in vitro [illegible] plus [illegible] sultats [illegible].

1) [illegible]

[illegible]

Le [illegible] de [illegible] (in vivo) [illegible]

[illegible] Il nous suf-

[illegible] *in vivo* [illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible] en [illegible]

[illegible] accine de bovin à bovin. Le passage [illegible] une éruption de pustules vaccinales en [illegible] par voie intradermique. Par le même [illegible] les virus de la clavelée et de la variole [illegible] de la peau, d'autres tissus tels que le [illegible] système nerveux, sont aptes à la culture du virus [illegible] cinal. Le virus de la rage, depuis GALTIER en 1879, puis PASTEUR, CHAMBERLAND, ROUX & THUILLIER, en 1881, se cultive par inoculation de la salive de chiens enragés au lapin ; le virus se multiplie dans le système nerveux central. Depuis, la plupart des virus ont été cultivés *in vivo* : fièvre jaune, herpès, encéphalites, pestes bovine, porcine, aviaire, maladie de Carré [illegible]

Soulignons l'importance considérable de l'obtention de ces souches virulentes comme produits vaccinants, sans modification (vaccine) ou après atténuation (rage, encéphalite...).

De bons résultats sont obtenus en sérothérapie et vaccination contre les maladies à virus filtrants : peste bovine, clavelée... à la seule faveur des produits virulents récoltés chez des malades.

La transmission des virus à des espèces non réceptives naturellement entraîne la nécessité d'artifices ; citons, par exemple, la difficulté de la transmission de la peste bovine au lapin. Pendant la guerre, une Commission américaine n'a pu la réaliser que par des inoculations alternées [illegible] lapin ; après trois passages veau-lapin le virus se transmet, régulièrement, en série, au lapin.

Les exemples sont [illegible] pour que nous puissions les [illegible] ayant trait au vi-

La culture *in vivo* du virus [illegible] a été tentée chez presque tous les [illegible]. Les expériences ont été dirigées dans les [illegible] que nous avons été amené, pour [illegible], à envisager les essais successivement sur chaque espèce animale sensible spontanément ([illegible]), puis artificiellement (rongeurs de laboratoire : cobayes, lapins, souris).

Il est certain que la production de virus sur les petits animaux de laboratoire est [illegible], mais deux difficultés se présentent : le virus ne cultive pas en grande

[illegible] qualités [illegible] pour [illegible] [illegible]

[illegible]

[illegible]tre revue critique commencera par les cultures *in vivo* [illegible]s chez les bovins. VALLEE & CARRE, dès 1924, so[illegible] [illegible] de cette espèce pour les recherches sur la fièv[illegible] [illegible] les autres espèces sensibles sont accessoires. [illegible] [illegible] C'est l'espèce bovine qui paie le plus lourd [illegible] à la fièvre aphteuse et c'est elle qui doit être p[illegible] le plus efficacement.

Le virus produit sur les bovins ne subit pas, [illegible] [illegible] passages sur d'autres espèces animales. C'est le seul p[illegible] pratique qui permet l'entretien des souches de vir[illegible] récoltées sur le terrain, lors des épidémies, et qui [illegible] intégralement, leurs propriétés. Cette espèce, par sa sensibili[illegible] et la précision de ses réponses, offre une sécurité presqu[illegible] absolue (RINJARD, 1929).

Actuellement encore, les cultures obtenues *in vivo* et *in vitro* doivent être passées, de temps en temps, sur des bovins [illegible] redonner aux souches leurs qualités primitives. Enfin le [illegible] [illegible] pour vacciner les bovins. Malheureusement c'est le côté économique qui rend l'emploi [illegible] animaux difficile. On sait le peu de rendement qu'offrent [illegible] bovins infectés expérimentalement, bien que le matériel réco[illegible] soit riche en [illegible].

[illegible]

Introduction :

[illegible] cas de toutes les maladies infectieuses il [illegible] [illegible] causal au niveau d[illegible] [illegible] l'endroit où se [illegible] [illegible] convient de réinoculer l'agent étiolo[illegible] [illegible] multiplication et reproduire la maladie.

[illegible] aphteuse, [illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

mum d'activité de virus à 1.10^{-6} pour son emploi dans la fabrication du vaccin anti-aphteux.

Historique :

Bien avant sa découverte, le virus aphteux avait été cultivé *in vivo* par différents auteurs, mais dans un tout autre but. Ils cherchaient, soit une preuve de contagiosité, soit un moyen de vaccination par la méthode de l'aph[illegible]ation (par imitation de la méthode de JENNER pour la variole). [illegible] cultivaient ainsi, sans le savoir, le virus aphteux sur la langue des bovins. Leur empirisme était bien compréhensible puisque les bases de la microbiologie n'étaient pas [illegible] PASTEUR (1860) et que l'on discutait âprement sur la contagion ou la non-contagion de la fièvre aphteuse.

Il semble que BUNIVA (1810) ait été le premier à réussir l'inoculation des aphtes, suivi, la même année, par SALOZ, sur ordre du Gouvernement suisse. Leurs prédécesseurs : DUFILS (1802), DELAFOND (1810) et les anonymes auteurs du rapport du Ministère de l'Intérieur sur la fièvre aphteuse (1810), n'ont pas réussi, probablement, pensons-nous, par suite d'une récolte trop tardive de la salive et des aphtes. Le vétérinaire suisse réussit à infecter 5 vaches sur 6 et 2 moutons sur 3, par frottement de bave sur la muqueuse buccale ou sur le mufle.

Les expériences de BUNIVA ont été répétées, à Weimar, par BRAVELL (1816), à Iena, par RENNER (1816), WIRTH (1838), SPINOLA (1863).

Les produits virulents et les modes d'insertion du virus sont recherchés : incisions cutanées (OLERC [illegible] Suisse, cité par ERCOLANI, 1858), bave introduite dans la bouche [illegible] bovins sains. LEVRAT (1830), KALTSCHMIDT (18[illegible]) [illegible] la formation des vésicules, non seulement aux [illegible] a été inséré, mais encore en d'autres [illegible] dans l'espace interdigité. La virulence de l'humeur des [illegible] buccales et de la salive est prouvée. L'humeur des [illegible] interdigitées, bien que virulente, ne peut être [illegible] la formation de pus. Le meilleur moment de [illegible] est " 3 ou 4 jours après que la "salivation a [illegible], l'humeur [illegible] des vésicules déchirées "étant mélangée [illegible] salive ". Celle-ci est recueillie " avec "la main dans la bouche [illegible] et cette main est passée "dans la bouche et sur la langue des animaux que l'on veut inoculer ". ([illegible], 1841). D'autres [illegible] d'inoculation sont préconisées : [illegible] interne des oreilles ([illegible], 1842, [illegible], 1843), injection sous-cutanée [illegible] ([illegible], 1852, [illegible]GRI, 1852), séton de 15 cm. imprégné de bave [illegible] (CAVALLI, 1856). Citons brièvement les modes d'inoculation préconisés par [illegible] (1899) : injection de [illegible] aphteuse dans les fosses nasales suivie de l'obturation des narines [illegible], égouttement de la sérosité aphteuse sur la conjonctive, projection dans l'estomac, l'intestin, la trachée, l'anus et le canal du trayon

Preuve de la culture :

Ces travaux empiriques peut-on dire, ont reçu une confirmation scientifique en 1898 par les célèbres expériences de LOEFFLER, FROSCH & UHLENHUT.

Ces médecins allemands prélèvent la lymphe par ponction aseptique de vésicules non rupturées et l'inoculent dans [illegible] bovin. Ils atteignent des dilutions au 1/?0.000 de cc. (rapport au [illegible] dilutions [illegible] 1898). La lymphe filtrée est employée avec certitude à transmettre la fièvre aphteuse d'animal à animal dans une longue série de sujets. Le dernier d'une série de 6 animaux contracte la maladie aussi vite que le premier, avec toujours la même [illegible] l'animal précédent et inoculée au sujet suivant. C'est la première preuve [illegible] dans le corps de l'animal malade. Voici le calcul de LOEFFLER : 1/50 cc. de lymphe filtrée injectée au premier animal produit dans ses vésicules 3 cc. de lymphe, en outre, la totalité de la lymphe injectée se retrouve excrétée dans ces 3 cc. et y représente 1/150 cc. Par conséquent, le 1/50 de lymphe filtrée injectée à l'animal suivant représentera

$$\frac{1}{150 \times 50}$$ de la lymphe originelle.

Le deuxième sujet produit encore 3 cc. de lymphe dont on injecte à un troisième 1/50 cc. La lymphe originelle est représentée par :

$$\frac{1}{150 \times 150 \times 50}$$

et ainsi de suite pour atteindre :

$$\frac{1}{150^{?} \times 50}$$ au sixième animal.

Ce dernier a donc reçu moins de

[illegible] lymphe d'origine,

or celle-ci n'est plus virulente au 1/50.000, il y a donc eu reproduction du virus dans le corps de l'animal.

Cette découverte était d'une importance primordiale pour l'étude pratique de la fièvre aphteuse car elle permet -c'est encore aujourd'hui le seul procédé- de conserver une souche de lymphe d'origine bovine à virulence presque constante. Depuis l'on n'est plus obligé de s'adres-

ser à des récoltes sur le terrain, lors des épidémies, pour s'approvisionner en virus aphteux. Ces souches sont entretenues par passages sur langues de bovins.

LOEFFLER pensait, à tort, en 1898, que l'alternance bovin-porc était nécessaire pour conserver la virulence, nous verrons que le passage de bovin à bovin est suffisant ; tous les actuels instituts anti-aphteux, de recherches ou de fabrication de vaccin, l'ont adopté et le pratiquent avec succès.

Technique de Laboratoire :

De tous les moyens d'inoculation du virus au bovin, le plus efficace est l'injection intra-dermique, dans la muqueuse linguale d'un bovin sélectionné n'ayant jamais eu à souffrir de la maladie, choisi en milieu indemne de fièvre aphteuse. Tout autre mode d'inoculation détermine la fièvre aphteuse, mais les aphtes ne sont pas plus abondants, au contraire. Il est évident que seuls les aphtes de la cavité buccale sont utilisables ; ceux des espaces interdigités, des pis ou des piliers du rumen -relativement fréquents- sont à rejeter du fait de la difficulté du prélèvement, de leur faible volume, de leurs souillures.

La préparation de la solution virulente est simple : après le prélèvement sur la langue aphteuse, il suffit de broyer les parois d'aphtes le plus finement possible, au mortier par exemple, en présence de sable de quartz. Selon le Professeur CLAUDE de l'Institut Rockfeller à New-York, pour broyer totalement les cellules il faut des grains de même dimension que les cellules. Le broyage est dilué en eau physiologique, de préférence tamponnée. La dilution est injectée par voie intradermique dans la muqueuse de la langue. 24 à 48 heures après, la récolte de la lymphe se fait par aspiration à la seringue et la paroi des aphtes est recueillie aux ciseaux ou par grattage.

Technique Industrielle :

La production du virus sur le plan industriel se pratique maintenant couramment. De magnifiques Instituts ont pris naissance dans toutes les parties du monde. Ce ne sont plus des laboratoires, mais de véritables usines.

Citons, en Europe, ceux de l'Ile de Riems et de Fribourg (Allemagne), de Bâle (1) (Suisse), de Pirbright (1), au milieu d'un camp militaire (Angleterre), de l'Ile de Lindholm-Copenhague (1)

(1) Nous remercions vivement ici tous les Directeurs de ces Instituts qui nous ont fait le grand honneur de nous faire visiter leurs installations, nous ont donné, avec bienveillance, tous les renseignements désirables, nous ont fait bénéficier de leur expérience et nous ont accordé une si franche hospitalité.

(Danemark), d'Amsterdam (1) dans le port de guerre (Hollande), de Bruxelles (Belgique), de Brescia[1], Rome, Padoue (Italie), de Leon (Espagne), de l'île de Gorodombia dans la Volga (U.R.S.S.), de Lyon (1) et Villefranche s/Allier (1) (France).

En Amérique, il en existe en Argentine, au Brésil, au Mexique. Les U.S.A. vont entreprendre la création d'un Laboratoire probablement situé aux environs de la frontière mexicaine.

Ces Instituts, généralement annexe d'un Laboratoire de Recherches proprement dit, sont, pour le plus grand nombre, des établissements d'Etat, ce qui se conçoit facilement, étant donnés les frais énormes de construction et les aléas de la vente du vaccin, très variable selon les années.

Nous ne pouvons décrire tous les Instituts actuellement existants, ils sont trop nombreux. Nous donnerons les principales caractéristiques des Instituts "type industriel" dont celui de [illegible] doit être considéré comme le premier en date, mais nous ne devons pas oublier les Laboratoires de Recherches [illegible] leur ont servi de modèles.

Le premier [illegible] est le [illegible]ratoire National de [illegible] en 1905, à Alfort, pour l'étude de la fièvre [illegible] laboratoire français est le premier des [illegible] adaptés pour l'étude d'une maladie contagieuse. [illegible], alors Ministre de l'Agriculture, d[illegible] l'insistance de NOCARD & ROUX décida son édification [illegible] les plans.

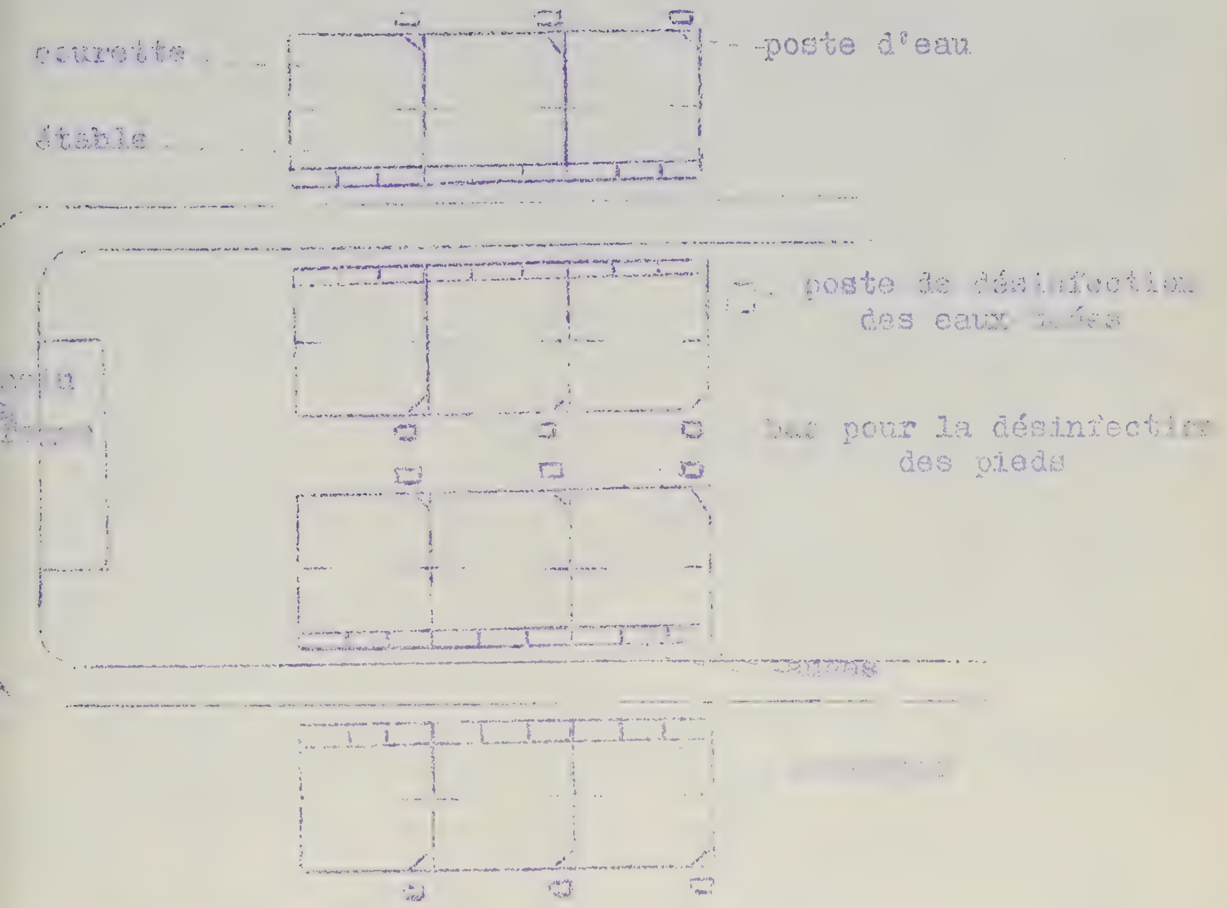
Les bâtiments [illegible], pour l'époque, uniques en leur genre, et si bien conçus que [illegible] son prestigieux Directeur pendant près de 30 ans, pouvait écrire, en 1929 : "... mon propre laboratoire ... est immédiatement voisin d'une laiterie qui, depuis plus de 30 ans, n'a jamais connu l'existence de la fièvre aphteuse, tandis qu'un seul mur, [illegible], nous sépare." Les successeurs de VALLÉE : [illegible], J.-P. [illegible] ont pu et peuvent répéter cette [illegible]

L'originalité du Laboratoire d'Alfort consiste dans l'organisation de ses [illegible] : les boxes de 2 à 3 places sont séparés [illegible] et s'ouvrent chacun sur [illegible]

[illegible] dans les couloirs, distribuent, par des [illegible], la nourriture et l'abreuvement. Ils n'ont pas à entrer dans les [illegible]. Les eaux sont évacuées

---

[illegible]


poste d'eau
étable
poste de désinfection
bac pour la désinfection
des pieds

[illegible]

[illegible]

[illegible]

cinéma). Des conduites sous-marines amènent l'eau potable, l'électricité et permettent les communications téléphoniques avec Greifswald. Des bateaux ou un téléphérique assurent le passage contrôlé du personnel autorisé, des animaux et du matériel.

Le laboratoire comporte un sous-sol largement [illegible] dont l'air est "conditionné", les installations spéciales de préparation et de manipulation du virus et du vaccin. Les petits animaux de laboratoire y sont rassemblés. Deux étages abritent les services de recherches.

A proximité de ce bâtiment se trouve une série de constructions permettant d'avoir une réserve de 1.000 bovins et, tout à côté, des installations pour l'inoculation des animaux, les récoltes des aphtes, les saignées, un abattoir avec resserre réfrigérée.

Très isolées de ces locaux, à une centaine de mètres, sont des étables réservées à l'épreuve du vaccin, au point de vue de son innocuité et de son efficacité.

Des précautions minutieuses sont prises pour passer d'un groupe de bâtiments à un autre.

En annexe, différents services assurent le fonctionnement de ces installations : centrale de production de vapeur, salles de compresseurs pour l'installation frigorifique, ateliers divers. Les eaux polluées sont désinfectées avant d'être jetées à la mer et les fumiers incinérés dans d'énormes fours.

En 1927, la station d'expérimentation sur la fièvre aphteuse de l'île de Lindholm (Danemark) est édifiée par [illegible], après des conseils des spécialistes des stations [illegible] : VALLÉE, [illegible]. Les frais de construction sont, à l'époque, de 500.000 couronnes, son budget annuel de fonctionnement est fixé à 60.000 couronnes.

Le nombre de vaches sacrifiées chaque semaine était de 420 à 500 en 1938. Chaque vache donnait 50 gr. de virus en moyenne, ce qui permettait de produire du vaccin suffisant pour plus de 100.000 bovins par semaine, soit l'ensemble du cheptel danois en un peu plus de 6 mois.

Pour éviter toute contamination éventuelle des animaux de laboratoire au bétail des environs, ou vice-versa, l'île de Lindholm, isolée et inhabitée (4 hectares), située dans la baie de Stege, a été choisie. La distance minimum entre l'île et la côte est d'environ 3 km. Les fonctionnaires de la station sont les seuls habitants de l'île. Le public [illegible]

[illegible] des constructions montre l'[illegible]

la station : chenal, pont de débarquement avec voie de wagonnets, câble sous-marin, un ferry-boat, 2 bateaux à moteur, une allège pour le transport des bestiaux, plusieurs petits bateaux et automobiles. Pour les bâtiments : laboratoires, étables, station électrique, station de chauffage, maisons d'habitation, locaux de réception, abri pour les cobayes (20.000 cobayes de races sélectionnées par an)....

Le laboratoire (salles de travail, étables) forme un carré séparé par des murs de [illegible] mètres du reste de l'île, il constitue la zone infectée ; le changement de vêtements à l'entrée et les douches à la sortie sont obligatoires. L'aménagement du laboratoire rappelle celui des salles d'opérations : parois enduites d'un vernis [illegible], fenêtres fixes, portes à double ouverture ; les portes [illegible] sont [illegible] une [illegible] pour éviter la sortie de [illegible]. Les [illegible] des étables sont plus [illegible] qu'à Alfort, pour faciliter leur désinfection. Les coins et les saillies sont arrondis, le [illegible] est lissé et les lampes d'éclairage scellées dans le plafond. L'alimentation et l'abreuvement s'effectuent sur le type du laboratoire d'Alfort.

Les cadavres et le fumier sont incinérés dans un four K[illegible] [illegible] de vapeur d'eau permettant la désinfection du petit matériel. Les eaux usées sont collectées dans une cuve dans laquelle [illegible] de vapeur d'eau les porte à l'ébullition pendant 4 heures. Elles sont ensuite conduites en mer, par un canal, à 60 mètres de la côte.

La section bactériologie du Laboratoire et l'administration ne sont pas dans la zone infectée.

La préparation du vaccin se fait dans un laboratoire [illegible] à Copenhague. L'air du laboratoire et des étables [illegible] et est stérilisé par la chaleur accumulée dans [illegible].

[illegible] frigorifique), [illegible]

Il n'existe pas de [illegible] et renouvelé en [illegible] personnel [illegible] à la sortie ; pour [illegible] lactique.

L'Institut [illegible]

par le Docteur FREI, et composées de MM. FLUCKIGER, SCHMID, HALLAUER, UNGER & KEHLSTADT.

L'organisation et la qualité du matériel sont remarquables. Les dépenses de construction des bâtiments ont atteint 1,60[illegible] Francs suisses, l'installation intérieure 200.000 Francs suisses.

L'Institut est placé en dehors du trafic de la ville de Bâle et en rapport direct avec l'abattoir et le centre de destruction des cadavres. Il a été conçu pour donner toutes les garanties désirables vis-à-vis du danger éventuel de la contagion.

La partie septique ou contaminée comprend les endroits où l'on manipule le virus, elle est strictement séparée de la partie aseptique.

La zone contaminée se compose de :

- l' "étable à virus" séparée en deux parties où peuvent séjourner 38 animaux en incubation ; entre les rangées d'animaux, des travails sont prévus pour l'inoculation des langues.
- un local situé entre les deux parties de l'étable à virus qui sert de réserve à la paille et au foin distribués par un appareil pneumatique,
- une salle de récolte du virus,
- la halle d'abatage qui communique directement avec l'établissement municipal de destruction des cadavres,
- un laboratoire de préparation du vaccin.
- une pièce meublée pour le personnel.

La diffusion du virus dans le milieu extérieur est évitée par les mesures suivantes :
Toute personne est tenue de quitter ses vêtements en pénétrant dans la partie contaminée, à la sortie elle est [illegible]. Les eaux usées sont chauffées à 80° pendant 20 minutes, elles sont ensuite refroidies à 35° avant d'être évacuées dans la canalisation municipale. Les opérations sont contrôlées par un appareil électrique automatique, dès qu'une faute se produit un signal d'alarme se déclenche. La verrerie est placée dans un autoclave qui est déchargé, après stérilisation, dans la partie aseptique. La paroi extérieure des bouteilles de vaccin est stérilisée par lavage dans une solution de lessive de soude. La viande séjourne dans le frigorifique deux fois 24 heures, temps suffisant pour que la maturation par production d'acide lactique tue le virus. Les peaux sont recouvertes de sel et de soude, quatre fois successivement au cours de 4 semaines. Le fumier et le contenu des réservoirs gastriques sont placés en couches de 10 cm. dans un autoclave à double ouverture, les portes

s'ouvrent, alternativement, soit du côté septique, soit du côté aseptique ; la température est également contrôlée automatiquement. Les locaux ont des fenêtres à double vitre. L'atmosphère est conditionnée par une série d'appareils automatiques qui assurent : aération, température et humidité appropriées selon les saisons. Les appels d'air provoqués par une dépression dans les locaux sont assurés par des bouches pourvues d'appareils filtrants. La sortie d'air s'effectue sous pression à travers une série de filtres à huile qui arrêtent poussières et insectes.

Dans la partie aseptique se trouvent :
l'entrée où s'effectue le contrôle, les bureaux, les laboratoires, les entrepôts de matériel, la frigorifique pour le stockage des [illegible] de vaccin. En sous-sol, sont logées les installations électriques, frigorifiques et de chauffage. Un téléphone [illegible] automatique permet d'appeler toute personne se trouvant [illegible] ment dans chaque pièce.

L'Institut possède une "étable d'épreuve" autonome dans laquelle le vaccin est éprouvé au point de vue de son activité et de son innocuité. Une entrée spéciale est plombée intérieurement après l'introduction des animaux. Le gardien de service de jour et de nuit nourrit, abreuve les animaux, enlève les fumiers sans avoir de contact avec les vaches. Il ne peut sortir qu'après désinfection par douche. Le vétérinaire se soumet aux règles de désinfection pour vacciner, il surveille par une fenêtre close.

Avec [illegible] animaux le laboratoire peut préparer normalement [illegible] litres de vaccin par semaine. En cas d'urgence, il peut assurer une production de 400 litres par jour.

L'Institut Français de la Fièvre Aphteuse (I.F.F.A.) fondé par les Docteurs Ch. MERIEUX et M. VALLEE, a développé ses installations dans les abattoirs de la Mouche, à Lyon, sur l'initiative du Président HERRIOT. Il est dirigé avec compétence par le Docteur GIRARD assisté du Docteur MACKOWIAK.

Les bâtiments affectés à l'Institut jouissent d'une voie particulière de chemin de fer.

Les constructions ont été conçues en s'entourant de toutes les précautions [illegible] pour éviter toute contamination. Les opérations s'y succèdent en sens unique, sans retour en arrière : c'est le type abattoir horizontal, tout en longueur.

L'abattoir et une partie du laboratoire sont contaminés, donc isolés ; l'autre partie du laboratoire et un parc d'attente destiné aux bovins à inoculer sont indemnes de virus aphteux. Une barrière de douches pour le personnel et les visiteurs sépare les deux parties. Le matériel [illegible] dans la zone contaminée [illegible] par des autoclaves à double [illegible] sur les deux zones.

[illegible] la zone infectée se succèdent, après l'entrée des bovins [illegible]

virus, du vaccin, la sortie des viandes assainies et des déchets.

Les boeufs, généralement de race charolaise, après leur débarquement à quai, sont dirigés dans le couloir de triage, puis dans le parc d'attente. Ils sont acheminés, par un couloir abrité, considéré déjà comme infecté, vers les [illegible] d'[illegible]. Celles-ci, situées l'une après l'autre, comprennent 80 places avec [illegible] permanents : l'une est réservée au virus type A, l'autre au virus type [illegible]. [illegible], deux petites étables de 5 places chacune, servent à éprouver le vaccin au point de vue de son innocuité et de son efficacité. Dans la salle d'abattage les boeufs sont tués, les langues prélevées sont suspendues dans le petit laboratoire attenant. Les aphtes sont raclés en prenant soin de conserver toute la lymphe, le tout est pesé et congelé à -30°. Le travail ultérieur [illegible] filtres se fait dans un laboratoire spécial attenant [illegible]. Le vaccin est préparé dans deux mélangeurs de 1.000 litres.

Le dépouillement et l'habillage terminés, les carcasses sont dirigées dans la resserre et vaporisées avec une solution d'acide lactique. Après un temps de maturation suffisant (48 heures au moins) et qui assure la désinfection, les viandes sont entreposées dans le frigorifique, elles sortent à l'extérieur par un [illegible] à ouverture automatique.

Les viandes saisies, les tripes (inutilisables après l'action de l'acide lactique qui les brûle), le sang, les cornes, les onglons et les [illegible] divers sont autoclavés et réduits en poudre ; les panses sont vidées, échaudées, raclées et [illegible] au frigorifique. Les peaux sont plongées 1/2 journée dans une cuve à bisulfate ou bifluorure de soude, puis égouttées. Les eaux résiduaires, les fumiers, contenus de panses, sont drainés dans deux cuves où ils sont [illegible] solution de soude à 10 p. 100. Le contact dure [illegible] au moins 1/2 heure, puis l'ensemble est rejeté [illegible] à l'égoût. Les deux cuves [illegible] et alternative.

Un petit [illegible] d'effectuer diverses analyses [illegible] de pH, opacité etc... [illegible] dans le laboratoire pour les [illegible] souches et les épreuves de [illegible]. [illegible] continue, organisation avantageuse pour la production du virus et du vaccin.

La zone non infectée comprend : les laveries-stérilisation, la réserve de flacons stérilisés, la [illegible] de mise en flacons du vaccin qui arrive directement des mélangeurs

par des conduites, le frigorifique à + 4° et un local d'emballage.

Pour être complet, signalons la partie administrative : bureaux, secrétariat, vestiaires, bar-buffet, les salles des machines : centrales thermique, électrique, frigorifique, la salle de préparation de la solution de soude (400 kilogrammes de soude sont employés par jour) et une étable de contrôle d'innocuité du vaccin permettant un isolement complet des animaux pour éviter toute contamination extérieure.

De larges baies et des hublots de verre permettent à un grand nombre de visiteurs de voir toutes les opérations, même dans la zone infectée. Cette réalisation a son importance pratique : elle évite une perturbation dans le travail et une source possible de contamination.

A l'abattoir de Villefranche d'Allier est installée, depuis septembre 1941, une succursale de l'I.F.F.A. ; elle prépare uniquement les aphtes qui sont transportés congelés à Lyon.

x

x x

En Amérique, nous avons des renseignements sur l'Institut National de la Fièvre aphteuse d'Argentine par la brochure de Don J.M. QUEVEDO & A. ROTTGARDT (1947). L'Institut, situé à 2 km. du centre de Buenos-Aires, inauguré fin 1939, dépend du Ministère de l'Agriculture.

La construction, de forme rectangulaire, a des murs en ciment avec des angles arrondis. Le sol peut résister aux lavages avec tous les désinfectants. La clôture comporte une double enceinte permettant un isolement complet.

Dans le bâtiment il existe quatre salles principales réservées : la première à la préparation des divers types de vaccin, la deuxième à la détermination des types de virus aphteux, la troisième à la culture du virus, la quatrième à la préparation des milieux de cultures, l'entretien et la stérilisation du matériel. De plus, il existe une chambre froide à 0° et à 7°.

Les animaux sont répartis en deux sections indépendantes l'une de l'autre comprenant chacune 13 boxes individuels et une étable de 15 places. Les sections sont rigoureusement isolées et elles peuvent être désinfectées facilement. Chaque section comprend des locaux aménagés pour l'entretien des animaux de laboratoire : cobayes, lapins, rats etc..... Au-dessus des boxes des locaux servent de réserve et à la préparation des aliments.

Un parc, divisé en deux parties, est annexé à l'Institut ; il reçoit les animaux convalescents et ceux mis en observation.

Un domaine, à 25 km., permet la récupération des animaux et l'approvisionnement en fourrage.

L'Institut peut aussi disposer de la ferme expérimentale de

[illegible] km., qui est construit uniquement à [illegible] de la fièvre aphteuse.

[illegible] personnel comprend : huit vétérinaires, dont le chef et le sous-chef, un pharmacien, un [illegible], huit aides spécialisés, un régisseur, un [illegible], quatre employés et un mécanicien-électricien.

Le Gouvernement de l'Uruguay a créé, en 1946, un [illegible] spécial pour la lutte contre la fièvre aphteuse et [illegible], dépendant du Laboratoire de Biologie animale du Docteur Miguel C. RUBINO. Il est [illegible] vétérinaires, un chimiste, 2 aides, un mécanicien, un chauffeur, 2 contremaîtres et 8 hommes. Le budget de construction et d'installation s'élève à 85.000 pesos, celui du fonctionnement à 61.000 pesos, celui du traitement du personnel à 6[illegible] pesos par an. Ces chiffres sont donnés pour montrer l'[illegible] consacrées à la fièvre aphteuse.

Dans le même esprit, nous devons signaler la conférence de San Salvador qui a siégé en 1947, à la suite des ravages causés au Mexique et au Nicaragua par les [illegible]. Elle groupait les Ministres de l'Agriculture [illegible] Costa-Rica, [illegible] Guatemala, [illegible]. Il a été décidé la création d'un Institut [illegible] sanitaire végétal et animal international, [illegible] de la sauterelle migratrice et [illegible] cette tendance d'édification d'Insti[illegible] retrouve dans les résolutions [illegible] tend à affecter, à chaque pays d'[illegible] dans la lutte contre la [illegible] par exemple le diagnostic des types en [illegible] pour le compte de tous les pays européens.

Conditions de production optimum de virus aphteux :

[illegible] l'Institut Vaccinal de Bâle G.A. [illegible] élève J. PAHRAT ont eu le mérite de [illegible] les meilleures conditions pour [illegible] tant et en quantité suffisante [illegible] actif pour pouvoir produire [illegible] 1.000.000 de gramme d'aphto[illegible] généralisée et assurer le développement d'

aphtes étendus et riches en lymphe. Cette activité doit être constante, c'est-à-dire ne pas être modifiée par les passages répétés sur bovins ou entre ceux-ci pendant le temps de conservation.

Pour obtenir un meilleur rendement de récolte en aphtes, [illegible] de la culture in vivo, il faut étudier les divers facteurs susceptibles d'influencer la production artificielle des aphtes par infection des bovidés. Nous envisagerons l'étude des facteurs favorables, défavorables ou indifférents, en nous [illegible] surtout des travaux [illegible] par [illegible] 2, [illegible]. Ces auteurs [illegible] expérimenter [illegible] sur un très grand nombre de bovins (4.220), ce qui leur a permis de tirer des conclusions admissibles.

Facteurs dépendant du virus :

Ils ont trait à la préparation du virus, à l'infection des bovins et au prélèvement du virus.

[illegible] et sa préparation :

Valeur des souches :

[illegible] virulente, viable et productrice de lymphe, la récolte du virus est différente selon la souche [illegible] chaque souche a ses caractères propres.

Par exemple, la souche Espagne II donne une récolte moyenne de [illegible] grammes (400 animaux) avec un écart entre les récoltes [illegible] ; la souche Palau, la moins intéressante [illegible] grammes avec [illegible] de 29,3 grammes.

[illegible] les souches, les lignées [illegible] fournissent [illegible] plus abondante (J. FARRAT, 1958).

[illegible] lymphe et de la [illegible] :

[illegible]

[illegible] tamponné aux phosphates

Préparation [illegible] virus :

Elle consiste dans l'isolement du virus [illegible] que [illegible] sible de son enrobage cellulaire, la suspension du virus dans un liquide le moins nuisible au virus, l'élimination des débris cellulaires et des microbes.

Broyage des fragments d'aphtes :

Il [illegible] particules [illegible] possible pour permettre au virus de passer dans le liquide de suspension.

Tout d'abord, les fragments d'aphtes sont coupés [illegible] ment aux ciseaux ou dans un petit hachoir de cuisine. [illegible] les petites quantités, nous avons vu, plus haut, que le [illegible] tier pouvait être utilisé. J. [illegible] lui reproche l'app[illegible] vrissement dû aux éclaboussures inévitables et à l'a[illegible] tion sur le sable de quartz ; il préfère le boyage [illegible] yeur de Borrel, modifié par Schweizergut et à l'In[illegible] de Bâle. Nous avons utilisé, avec succès, sous la [illegible] tion du Professeur J.- André THOMAS, pour les grosses [illegible] tités, le broyeur de Latapie ou l'appareil Turmix, ai[illegible] que le broyage, après congélation, dans un système de [illegible] teaux.

Liquide de suspension :

Il doit être [illegible] tamponné et isotoni[illegible] une température [illegible] Ces faits résultent d'un [illegible] de conservation du virus (p. 104 [illegible] pratique, en rapport avec le [illegible]

[illegible] anglaise modifiée

[illegible]

[illegible] différence :

[illegible]	1,06 gr. soit 89 cc. 1/15 mol.
[illegible]	0,12 gr. soit 15,2 cc. 1/15 mol.
[illegible]	[illegible]
[illegible] q.s.	1000

[illegible]

Résultats : 8% de récolte en moins, avec des solutions simplement tamponnées (PO_4HNa_2 1/180 mol.) 53,29 gr. par bovin sur 130, ou isotoniques (ClNa 9 p. 1000) 56,66 en moyenne sur 36. Un tampon au borate n'est pas favorable : 49,56 gr. par bovin en moyenne sur 46 bovins.

Nous employons le milieu de J.- André THOMAS que de nombreux essais, en particulier sur la conservation du virus aphteux, ont montré préférable au milieu classique. Voici sa formule :

ClNa	[illegible] gr.
PO_4H_2K	0,10 gr.
PO_4HNa_2	0,90 gr.
SO_4Mg	0,15 gr.
Eau bidistillée q. s.	1000 cc.

Le pH est important à considérer. La forme normale du virus aphteux est à pH 7,65. Les milieux précédents doivent être ajustés à la soude ; en particulier 25 cc. doivent être ajoutés à 1 litre de liquide de J.- André THOMAS pour atteindre le pH optimum. La température de la solution du virus ne doit pas être supérieure à 15° au moment de l'injection (H. VALLEE, J. PARRAT).

Elimination des particules cellulaires
et microbiennes :

Deux moyens : la filtration sur bougies ou filtres Seitz E.K. qui ont le défaut de retenir, par adsorption, une certaine quantité de virus (p. 33),

la centrifugation, 8.000 tours pendant 10 minutes qui permet d'obtenir une suspension stérile bactériologiquement avec seulement la perte du culot de centrifugation.

Une expérience de J. PARRAT montre que 5.000 tours pendant 10 minutes sont insuffisants, il retrouve une moyenne de 100 microbes (coques en majeure partie) par cc. de suspension.

Nous avons vu (p. 36) que pour certaines de nos expériences faites sous la direction de J.- André THOMAS, la filtration sur Seitz peut être évitée grâce à une centrifugation, à 6.000 tours, de deux fois 15 minutes, en tubes refroidis. Les ensemencements sur gélose, de la suspension virulente, sont alors bactériologiquement stériles.

Technique d'infection :

Contention et anesthésie :

A Alfort, le personnel d'infection comprend 5 personnes : un vétérinaire, un garçon de laboratoire, un boucher et deux aides. 30 bovins sont infectés dans la journée.

[illegible] de 24 heures. L'animal [illegible] moment de l'inoculation, est immobilisé dans un travail [illegible] langue, lavée par un jet d'eau, est insensibilisée par une injection intraveineuse de 10 à 20 gr. de phényl-éthyl barbiturate de sodium (W. FREI) ou, plus simplement, par frottement local à l'aide d'un tampon imbibé de procaïne ou de scurocaïne.

A Alfort, avec Monsieur le Directeur THIERY et Léone SALOMON (1), nous avons confirmé l'intérêt de l'anesthésie [illegible] par injection intraveineuse [illegible] d'une solution [illegible] de phényl-éthyl [illegible] de Bâle nous a donné [illegible], un état de somnolence suffi[illegible] se laisse facilement manœuvrer et inoculer. L'anesthésie au chloral oblige à coucher l'animal ; [illegible] quelques accidents nerveux, sans avantage appréciable sur le chloral.

Nombre des injections intradermiques et quantité de virus injectée :

[illegible] la langue est attirée dehors. La [illegible] langue doit être infectée pour [illegible] rieure ne forme qu'un seul aphte (évolu[illegible] [illegible] physiologique tamponnée, [illegible] seringue de 2 cc. munie d' [illegible] cette méthode légère[illegible] avec une seringue de 10 cc [illegible] gr. en moyenne par [illegible] A l'Institut danois [illegible] seringue munie d' [illegible] portant plusieurs aigu[illegible] [illegible] continue, il est fait [illegible] supérieur : 74,15 gr. [illegible] sur 1.173 bovins.

[illegible]

[illegible]

[illegible] ou trop long en[illegible] une perte de poids [illegible] 24 à 26 heures après [illegible] pas suffisamment [illegible] plus de la [illegible], la virulence [illegible]

Deux jours après la rupture des aphtes, il est bien établi ([illegible] 19[illegible]) que la salive "perd toute efficacité contagifère", à moins qu'elle ne contienne des lambeaux épithéliaux et [illegible] en 1915, confirme que 60 bovins "reconnus ensuite "sensibles à l'infection" ne s'infectent point, malgré une tentative d'infection avec des produits recueillis dans la bouche de "malades portant les aphtes en voie de cicatrisation".

Ces expériences sont confirmées par [illegible] & [illegible] ([illegible]), [illegible] (1922) et VALLÉE (1922).

Nous avons remarqué, à la suite de bien d'autres, que le prélèvement tardif des aphtes de cobayes entraîne une diminution très rapide de leur activité, dès le lendemain de la généralisation. S'ils sont recueillis dès leur formation, ils se conservent des mois, soit à sec à 20°, soit en milieu conservateur glycériné et tamponné.

Il y a perte de la virulence sur l'animal vivant peut-être seulement en raison de la température, puisque sur les aphtes des coussinets plantaires des cobayes la salive n'intervient pas, et de l'action des anticorps qui, nous semble-t-il, apparaissent extrêmement rapidement, presqu'en même temps que la multiplication du virus (p. 289).

Technique de la récolte :

La récolte se fait sur animal anesthésié sur une table d'opération ([illegible]), pour être conservé comme producteur de sérum, ou abattu par la boucherie ([illegible] et Lyon) ou détruit ([illegible] : animaux tuberculeux). Il est bien entendu que sur l'animal debout la récolte est [illegible] inférieure, elle atteint de 15 à 30 gr en moyenne. Après abattage, la langue est suspendue, lavée [illegible] à l'eau, la lymphe est prélevée par ponction et les aphtes [illegible] dans un [illegible]. Les produits virulents sont pesés (15 à 18 gr en moyenne, par bovin) et conservés dans des flacons [illegible], [illegible] à - 40°.

[illegible]

[illegible] caractères [illegible], un rôle [illegible] dant.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Les races de petite taille donnent un rendement plus faible car la surface de la langue est plus petite : race [illegible] 46,85 gr. ([illegible] têtes). Nos petites vaches breton[illegible] [illegible] laboratoire d'Alfort ont un rendement faible. [redacted]

[illegible] aucun rôle dans le développement des aphtes [illegible] récolte (moyenne sur 447 vaches) et 57 gr. [illegible]).

[illegible] raison de la taille et de [illegible] de la langue (P.144). Le jeune âge augmente la récepti[illegible] et la sévérité de l'infection.

L'état [illegible] l'individu joue un rôle plus imp[illegible]tant.

PARRAT obtie[illegible] chiffres de récolte moy[illegible] les animaux [illegible] les animaux [illegible] une recolte mediocre (43,5 gr.). [illegible] en accord avec les résult[illegible] [illegible]iques obser[illegible] terrain, soit au laborato[illegible] animaux bi[illegible], sont bien plus sens[illegible] aux ma[illegible] affaiblis. C'est un [illegible]ales et aux maladies bacté[illegible] [illegible]ment à la lumière des don[illegible] [illegible]ion des virus. Le métaboli[illegible]me des acides nucléiques d'un animal bien portant est éle[illegible] [illegible]

[illegible]

[illegible] évolution de la mala[illegible] [illegible]ent un rôle important [illegible] [illegible]ssement de l'immunité [illegible] Elle disparaît au bout

Maladies autres que la fièvre aphteuse :

Selon le principe du rôle d'un métabolisme élevé, plus les animaux sont malades et moins résistants, plus ils font une fièvre aphteuse atténuée avec faible rendement en aphtes. [illegible] a confirmé l'état clinique par l'examen des saisies à l'abattoir. La maladie (tuberculose ou autre) ne joue pas un rôle tellement par elle-même mais plutôt par son retentissement sur l'organisme. [illegible] des récoltes est proportionnelle au degré d'amaigrissement, sauf au stade de cachexie avancée. La récolte est cependant acceptable puisque les spécialistes [illegible] utilisent les animaux tuberculeux, ils y trouvent un intérêt économique et détruisent systématiquement les carcasses après les prélèvements.

État de la muqueuse linguale :

Epaisseur

Nous avons défini, au début de notre étude, ce que nous entendions par virus aphteux : le mélange corpuscules aphteux et [illegible] cellules épithéliales de la muqueuse. Le virus proprement dit [illegible] [illegible] un support : les débris cellulaires n'ont aucune [illegible]. La concentration de virus dans la muqueuse est variable. [illegible] pour exprimer une quantité [illegible] à [illegible] la lymphe ou les lambeaux d'aphtes. Il est bien évident que cette évaluation est fausse, il faut s'en contenter n'en ayant pratiquement pas d'autres.

La lymphe semble plus riche en corpuscules virus que les [illegible] [illegible] pense, avec raison, que c'est le fait des cellules [illegible] kératinisées de la couche supérieure de la muqueuse. Il a calculé [illegible] de la muqueuse linguale des animaux sains et trouvé 18,4 gr. par animal (moyenne de 10 bovins : 195 cm^2 de surface pour une épaisseur de [illegible]). C'est à peu près le poids qu'il obtient [illegible] pour l'extraction du virus : 20 gr. [illegible]. Il en conclut que le poids de la récolte [illegible] avec l'épaisseur de la muqueuse sans que nécessairement le virus [illegible] en proportion du poids. Le poids de la muqueuse linguale des animaux sains croît avec l'âge en raison de l'augmentation de la surface de la langue et de la kératinisation. PARRA[illegible] calcule le poids de virus par cm^2 : 1,5 ctgr. et trouve qu'il [illegible] [illegible] il pense obtenir une approximation [illegible] sans tenir compte de la [illegible] [illegible]
[illegible] la surface [illegible]

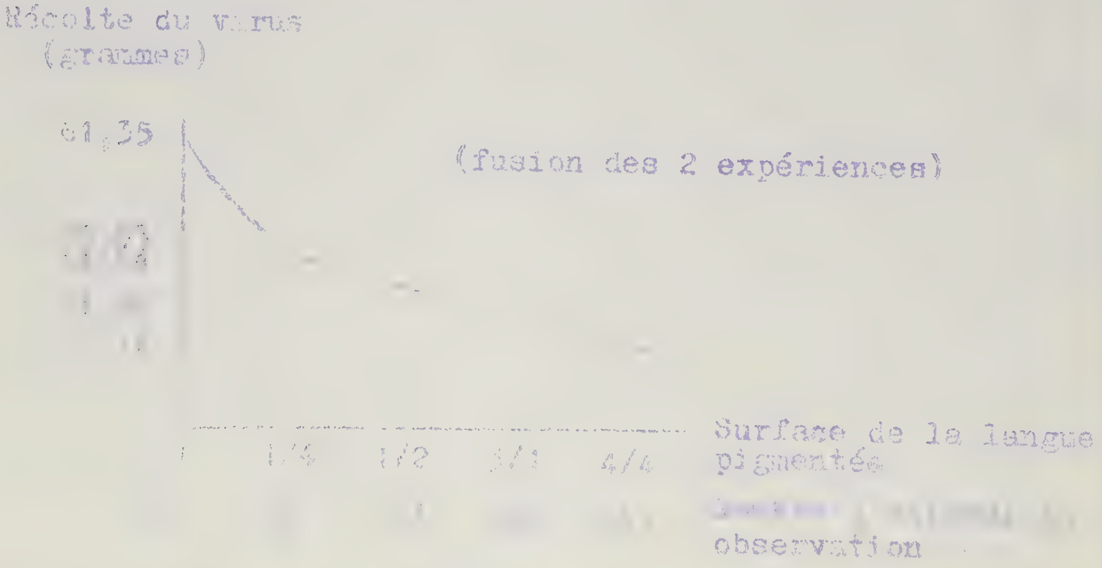
pour les raisons précédentes, introduire [illegible] dans le poids de virus récolté, car la couche [illegible] est particulièrement épaisse : le poids de la récolte augmente mais, en fait, la proportion de virus est plus faible.

Surface :

La récolte est évidemment proportionnelle à la surface de la langue, à sa finesse. Les cicatrices, les lésions aiguës ou inflammatoires de la muqueuse limitent la production des aphtes.

Pigmentation :

PARRAT a étudié ce facteur par deux séries d'expériences pour éliminer les causes d'erreur dûes aux autres fluctuations individuelles et au petit nombre d'animaux d'expérimentation. Les résultats étant parallèles dans les 2 séries, il peut en conclure une action défavorable faible sur la formation des aphtes, d'autant plus que les résultats sont proportionnels à la surface pigmentée. Nous avons résumé ses résultats dans la courbe suivante :



[illegible]sseur de la peau

[illegible] la relation entre l'épaisseur [illegible] lisse et la quantité de virus [illegible] était l'hypothèse (qu' [illegible] que l'épaisseur de la peau est un [illegible] la constitution générale de l'animal. Il a [illegible] d'expériences à l'aide de 2 souches de virus [illegible]. Les résultats sont concordants pour prouver [illegible] entre récolte de virus et épaisseur [illegible]

A une peau de bovin épaisse de moins de 6 mm. correspond une récolte de 54,60 gr. (1ère expérience sur 9 animaux) ou de 55,15 gr. (2ème expérience sur 12 animaux), alors qu'avec des peaux de plus de 10 mm. il obtient 76,2 gr. (moyenne de 10 bovins d'une première expérience) ou 70,15 gr. (moyenne de 12 bovins de la 2ème expérience). Les chiffres intermédiaires sont sensiblement proportionnels.

Influence de diverses conditions :

Influence de la température ambiante :

Le poids moyen de la récolte est abaissé si la température de l'étable est trop basse ou trop élevée. SCHACH a prouvé expérimentalement le rôle néfaste du froid (- 3°) sur l'évolution aphteuse du cobaye. 20° semble la température optimum aux expérimentateurs de Bâle, puisqu'à cette température les moyennes de récolte par animal sont supérieures de 2 à 7 gr. à celles de récolte effectuée de 10 à 17° C.

Influence du climat :

MOOSBRUGGER & PARRAT ont cherché à expliquer les baisses de rendement qu'ils ont remarquées, sans raison apparente, par le changement des conditions météorologiques dont les données leur ont été fournies par l'Observatoire de Bâle, 4 fois par jour d'inoculation : 7 h 30, 13 h 30, 21 h 30 et le lendemain à 7 h 30, état général du temps, température, pression barométrique, humidité relative de l'air, direction et intensité des vents, quantité des précipitations, durée du soleil, phases de la lune ; mais les facteurs sont trop variés, le temps étant la conséquence d'une combinaison particulière de plusieurs éléments, pour que les auteurs obtiennent, jusqu'ici, une conclusion satisfaisante.

Influence de la saison :

A l'Institut de Bâle, les récoltes sont meilleures à l'automne qu'au printemps. L'état de précarence de quelques animaux à la sortie de l'hiver est envisagée, ici encore le virus ne trouve pas les éléments à son parfait développement.

Conclusions :

Cette étude détaillée prouve les difficultés d'obtenir, à discrétion, les énormes quantités d'antigène nécessaires à la préparation d'un vaccin appelé à être utilisé, en temps d'épizootie, par centaines de milliers de doses.

Résumons les griefs que l'on peut reprocher à cette méthode.

Le rendement du "virus" ainsi cultivé est difficile, irrégulier, incertain ; les produits recueillis (liquide de sécrétion, [illegible], parois d'aphtes) constituent un matériel d'une virulence extrêmement variable.

VALLEE reproche aux virus issus des aphtes d'être bactériologiquement impurs (germes secondaires, souillures accidentelles). Leur filtration s'impose avec tous les risques d'appauvrissement. La teneur des aphtes et de la lymphe en virus, sa virulence et ses qualités pathogènes sont inconstantes. La quantité de virus varie [illegible] la quantité de lambeaux d'aphtes ou de pulpe récoltés est en moyenne de 30 à 60 gr. par animal. La production d'une grande quantité de virus exige l'emploi de milliers de bovins dont l'utilisation, après le prélèvement, est la source de soucis multiples. [illegible] par l'emploi d'animaux de grand format, la construction onéreuse de laboratoires isolés, le grand nombre de personnel indispensable, les contraintes de l'horaire des prélèvements etc... s'ajoutent aux réflexions précédentes pour montrer que cette [illegible] in vivo n'est pas satisfaisante. Découverte par NOCARD, ROUX, VALLEE & CARRE, cette culture in vivo a été adoptée par WALDMANN pour la production du [illegible] et tous les producteurs de vaccin anti-aphteux à sa suite. Elle est conservée actuellement, faute de mieux. "Cet artifice est "encore le meilleur dont on dispose pour l'obtention de "virus en grandes quantités" exposait VALLEE, en 1928, au centenaire de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse, c'est encore vrai.

Nous allons faire une étude critique des essais tentés [illegible] divers organes d'origine bovine.

Salive

[illegible] en 1842, a prouvé expérimentalement la virulence de la salive. Cette virulence paraît être fonction de la présence et de l'âge des aphtes.

Selon HECKER (1899) la salive conserve sa virulence seulement jusqu'au lendemain de l'éclatement des aphtes. Pour LECLAINCHE (1915), HUTYRA & MAREK (1920) cette virulence [illegible] que les aphtes sont en voie de cicatrisation. LEBAILLY (1922), puis VALLEE (1929) admettent 4 jours. La virulence de la salive apparaît au début même [illegible] elle précède l'[illegible] symptômes, même 10 heures [illegible] aphte et disparaît après [illegible] précoce que le Professeur VERGE [illegible] heures après l'inoculation [illegible]

Tout récemment, en 1949, le Docteur Antonio MARXER vient de publier le résultat de ses travaux sur une production abondante d'origine salivaire du virus aphteux. Il injecte une quantité déterminée de pilocarpine à un bouvillon inoculé de virus aphteux depuis 48 heures par voie sous-cutanée. En examinant son abondante salive il note la présence de virus aphteux ne provenant pas des aphtes puisque la langue en est encore exempte. Le point de départ de ses expériences est dû aux tentatives d'amélioration de la production des sérums anti-toxiques par injection d'anatoxine de RAMON aux animaux producteurs. Pour augmenter la production des anti-toxines, on injecte, en même temps, les substances les plus variées, entre autres de la pilocarpine. Cet alcaloïde augmente considérablement la teneur du sang en anti-toxines, dans la proportion, pense le Docteur MARXER, où l'eau du sang est éliminée et non par l'exaltation des moyens de défense de l'organisme. C'est donc en sens inverse que l'auteur emploie le produit de la salivation, la 1/3 partie de l'eau contenue dans le sang, comme source de virus aphteux. Il pense ainsi extraire le virus aphteux du sang où il est versé par les organes [illegible].

Cette source est abondante ; en collaboration avec Monsieur le Directeur THIERY et Léone SALOMON (1), nous avons confirmé la quantité de salive que l'on peut obtenir. Une vache bretonne (n° 660) de 250 Kg reçoit, par voie sous-cutanée, 25 ctgrs de nitrate de pilocarpine, en 3 heures nous avons obtenu 8 litres de salive. 48 heures après, la même vache, dans les mêmes conditions, a salivé 11 litres, soit, pour les 2 épreuves, 19 litres. L'abondance de la sécrétion salivaire est un inconvénient. Elle donne un produit visqueux difficilement injectable. La richesse en virus et le titre sont inconstants. Cette méthode, si séduisante, doit être confirmée par de nouveaux résultats. Le Docteur MARXER fabrique, avec la salive, un nouveau vaccin atténué par le thymol, dont les premiers essais sont très encourageants.

SANG

[illegible], en 1863, affirme la virulence du sang. [illegible] le nient en 1896. Un an après LOEFFLER & FROSCH le prouvent expérimentalement par inoculation au veau de 100 cc. de sang d'animaux infectés. Mais c'est surtout HECKER, Vétérinaire à [illegible] qui, par ses importants travaux ([illegible]) exposés au Congrès International de Médecine Vétérinaire de [illegible] (1) [illegible] et auxquels VALLÉE se plaisait à rendre hommage, en a révélé l'importance. Il [illegible] une source plus [illegible] [illegible] le sang des bovins [illegible]

---

(1) [illegible]

du début de la fièvre avant l'éruption. A ce moment le sang est très virulent et il est possible d'en obtenir une quantité voulue par la saignée. Il pensait que le sérum pouvait très bien remplacer la lymphe virulente des aphtes. Cette étude a été reprise par NOCARD, ROUX, VALLEE, CARRE. Ces auteurs préfèrent comme source de virus "le sang récolté à la période d'ascension thermi-"que chez des génisses infectées". "De ce point de vue "le porc est inutilisable". "Recueillir du sang au mo-"ment favorable", écrit VALLEE, "c'est en quelque sorte "obtenir cette culture tant recherchée, et point enco-"re obtenue, du virus aphteux". Au début de l'infection aphteuse, le sang représente, d'ordinaire, une véritable culture abondante, bactériologiquement pure du virus de la maladie, surtout par comparaison avec le contenu des aphtes qui renferme presque toujours, avec le virus aphteux, des débris cellulaires, des bactéries diverses et des moisissures. Le sang est généralement actif après dilution au 1/1.000, parfois même au 1/5.000. La quantité de virus présente dans le sang circulant est considérable.

VALLEE compare sa richesse en virus aphteux à la teneur en germes de la plupart des cultures des microbes figurés. Le plasma sanguin, le sang défibriné, le sérum, les globules rouges lavés sont virulents. A la glacière, le sang défibriné conserve sa virulence des mois, les globules plus longtemps que le sérum (VALLEE 1924). Pour VALLEE & CARRE, le virus aphteux est adsorbé par les globules rouges, il ne s'agit pas d'un parasite intra-globulaire. La virulence du sang ne serait due qu'à un simple transport [illegible] du virus, ce qui expliquerait sa présence [illegible] et sa concentration faible et variable et, de plus, s'il y avait multiplication dans le sang, il serait rapidement détruit par les défenses naturelles de l'organisme [illegible]; 2ème rapport anglais [illegible]. En somme la [illegible] de culture [illegible] pas [illegible]. VALLEE et les membres de la Commission anglaise ont également prouvé la variabilité et l'inconstance de la teneur du sang en virus, selon les individus et selon les sujets.

La virulence du sang est transitoire, elle ne s'observe que durant quelques heures et c'est ainsi que [illegible] ne l'ont pas mise en évidence. Les [illegible] (1910) puis, et surtout, [illegible] (1914-1918) ont déterminé les moments de virulence du sang [illegible] les périodes d'ascension de [illegible] l'infection aphteuse de l'animal

par 1 à 3 poussées thermiques successives de 2 à 10 heures, avant même l'apparition des premiers symptômes de la fièvre aphteuse. Entre chaque élévation de température, la fièvre tombe et le sang diminue ou même perd sa virulence. Ces auteurs, par des saignées systématiques, ont montré que la virulence des hématies atteint son maximum au commencement des 2ème et 3ème accès, moment de la constitution de l'aphte primaire, alors que celle du sérum est atteinte au sommet de l'accès. Les hématies perdent leur virulence dès la descente de la courbe thermique, tandis que le sérum conserve la sienne. Le 5ème jour après l'infection, 97,4 p. 100 des sangs de 100 bovins ne sont plus virulents. Le taux le plus élevé s'observe, en général, de la 20ème à la 36ème heure après l'infection (J. PARRAT 1945). Autres inconvénients : NOCARD, ROUX, VALLEE, CARRE montrent que la teneur du sang en virus (sang infectant dilué au 1/5) est beaucoup plus faible que celle de la lymphe des aphtes et encore plus que celle du produit de broyage des lambeaux de l'épithélium lingual (infectant au 1/20.000) qui renferme davantage de virus que tout autre produit organique. VALLEE admet que le sang est 1.000 à 10.000 fois moins riche en éléments spécifiques que la lymphe des aphtes de la langue. BEDSON, MAITLAND & BURBURY (1927) trouvent que la dilution infectante la plus élevée du sang de cobaye varie entre 1/500 et 1/1.600 alors que la lymphe des vésicules titre entre 1/500.000 et 1/5.000.000. Dans la situation la plus favorable, PARRAT a calculé qu'on ne peut retrouver dans le sang total et dilué dans 30 litres de liquide que les 4/10 du virus contenu dans 50 gr. d'aphtes de la langue de l'animal. Le sang est donc une mauvaise source de virus en raison du ballast inutile et de sa faible et irrégulière concentration en virus. La virulence du sang explique, en partie, celle des organes qui le renferment en abondance (foie, rate) et de toutes les sécrétions.

Lait et culture intramammaire

Le lait est pathogène pendant la période d'invasion, même avant toute éruption (TERNI, 1916 ; LEBAILLY, 1920). Sa virulence provient d'une part de la généralisation sanguine (opinion [illegible] par NOCARD & LECLAINCHE, 1901, puis [illegible], 1937) et, d'autre part, de la rupture des aphtes de la mamelle. Il n'y a pas de culture dans le lait.

NOCARD, ROUX, VALLEE & CARRE ont eu l'ingénieuse idée de faire une culture intramammaire du virus. L'inoculation de lymphe ou de filtrats virulents dans les trayons de la mamelle en lactation de vaches saines aboutit, après 24 heures, à la modification de la sécrétion lactée. Le lait diminue d'abondance, jaunit, s'enrichit en [illegible] et en leucocytes. Il est virulent jusqu'au [illegible] jour, moment où il redevient d'aspect normal et où l'animal [illegible] [illegible]alement la maladie.

Une culture intramammaire du virus est probable car la quantité [illegible] injectée est minime par rapport à celle du lait recueilli.

[illegible] 1/274.492.294.[illegible] dès le [illegible] jour de l'inoculation. Dans ces conditions, une vache [illegible] 2 litres de lait virulent. [illegible] récolte aseptique), la présence du lait [illegible] altération facile, sa résorption très lente, [illegible] satisfait nos illustres chercheurs puisque [illegible], d'accord avec eux, considère, à Londres, en 1914, c[illegible]ture comme inutilisable. Le dépouillement des pr[illegible] [illegible] de Recherches d'[illegible] sans compter les titrages sur bovins ou porcelets, du lait virulent, nouvelle preuve, s'il en faut, de la probité scientifique de ces savants ne publiant que les faits [illegible] d'expériences [illegible]

Urine

On ne peut considérer l'urine des bovins infectés [illegible] BIELANG (1923), TRAUTWEIN, THOMASHOFF & HOVE (1928). WALDMANN (1928). PYL (1931) a concentré le virus de l'urine par adsorption sur charbon, hydroxyde d'aluminium [illegible] rapport de la Commission Anglaise de 1937 étudie en détail [illegible] l'urine.

Le pH de l'urine bovine fraîchement recueillie est généralement de 7,8 à 8,5, il a tendance à s'alcaliniser [illegible] à un pH trop alcalin. Le meilleur moyen est d'acidifier l'urine avec PO4KH2 N. à 7,0 et d'augmenter la tension de [illegible] avec un liquide de pH 8,0 à 9,2. L'urine [illegible] proportion de 27 sur 50 cobayes atteints de fièvre aphteuse. Mais la tentative d'[illegible]rption du virus de cobaye guéri depuis 10 à 15 jours [illegible] positive. Dans le cas de diète ou de fièvre [illegible] (diète également), l'urine de [illegible] très acide, elle peut atteindre [illegible]

et il est évident qu'à ce [illegible] le virus est détruit.

Humeur aqueuse

L'inoculation de virus aphteux dans la chambre antérieure de l'oeil de 2 génisses, expérience faite par [illegible] et CALINESCU, en 1914, a été suivie d'une maladie très sévère (après une incubation très courte) et d'une immunité solide. Quelques gouttes de liquide de la chambre antérieure de l'oeil inoculées par voie intra-veineuse à 2 génisses provoquent la fièvre aphteuse.

Il serait intéressant de reprendre ces expériences interrompues par la guerre pour savoir s'il y a multiplication du virus aphteux dans l'humeur aqueuse.

Liquide amniotique

Signalons que LE ROUX (cité par VALLEE, 1922) a observé, incidemment, un cas de virulence du liquide amniotique chez une vache infectée. Le Dr [illegible] a démontré, au laboratoire, le même fait chez le cobaye. Nous pensons qu'il y aurait lieu de reprendre cette étude chez la vache, [illegible] une grande quantité de liquide qui serait une source abondante d'antigène.

Liquide de brulûres

Une série d'expériences très instructives a été faite par les auteurs [illegible] (1914). Ils ont [illegible] la virulence du liquide des vésicules de brulûres [illegible] sur la peau d'une génisse en évolution de fièvre aphteuse. Les vésicants habituels ne leur avaient donné que des résultats imparfaits. Un veau inoculé avec le liquide de ces vésicules a la fièvre aphteuse au bout de 6 jours. Il est également cautérisé. Le liquide de ses vésicules est inoculé, par voie intraveineuse, à un 2ème veau chez lequel il détermine une fièvre sans lésions spécifiques. Ce 2ème veau se montre réfractaire à une injection de lymphe aphteuse.

Culture en symbiose avec le virus vaccinal

M. BELIN a cherché à obtenir une culture simultanée de 2 virus filtrants dermotropes, autrement dit la culture du virus aphteux dans des lésions produites par le virus vaccinal, sur les bovins vivants. Il [illegible] le mélange des deux ultra-virus qu'il dénomme "complexe vaccino-aphteux". Les bovins sont également réceptifs aux deux virus. D'après M. BELIN, les deux germes inoculés sur le même animal, en des régions différentes, cultivent tout d'abord séparément : le virus vaccinal sur la peau, le virus aphteux

dans le sang, puis, ensuite, le virus aphteux se déve- [illegible] [illegible] localisation : bouche, pieds mamelle, dans les points où le virus vaccinal cultive [illegible] [illegible] recueilli en grande quantité mélangé au virus vaccinal. Les complexes "directs" sont recueillis au niveau des régions inocu- [illegible] [illegible] aphteux et les "indirects" sont récoltés dans le territoire vaccinal [illegible] [illegible] généralisation.

Voici la technique détaillée de la préparation des complexes vaccino-aphteux :

L'animal de choix est la génisse n'ayant pas été atteinte de fièvre aphteuse et provenant d'un milieu indemne de fièvre aphteuse. Elle est entièrement tondue, sauf la tête et la moitié antérieure de l'encolure, savonnée, lavée, rasée au niveau des épaules, du tronc, de la croupe et des cuisses ; la surface rasée est de nouveau savonnée, brossée, séchée avec des linges stériles, puis scarifiée. Sur les scarifications essuyées, la pulpe vaccinale broyée est étendue sauf au niveau de l'épaule et de la région dorsale droite recouverts des complexes vaccino-aphteux. Le virus aphteux peut aussi être inoculé en dehors du champ préparé, dans [illegible] côtés de l'encolure spécialement rasée. L'animal est entouré de deux toiles stériles solidement fixées, elles sont changées tous les jours. La génisse est surveillée dans une salle [illegible] à la température de 12 à 16°. Le 4ème ou le 5ème jour de l'évolution vaccinale, l'animal est sacrifié [illegible] totale. La récolte des complexes [illegible] sur les régions inoculées de virus aphteux : elle se fait [illegible] dans une large cuvette stérile. [illegible] une pulpe contenant à la fois et en grande quantité les deux virus : aphteux et vac- [illegible] [illegible] nettoyage et la désin- [illegible] [illegible] utilisés, à l'eau [illegible] [illegible] par vaporisations de [illegible] virus amené par le sang [illegible] scarifications et con- [illegible], en ces points, son évolution en culture simultanée avec le virus vaccinal. Il cite, à l'appui de son [illegible] les expériences de [illegible] & TRAUTWEIN qui constatèrent qu'après une injection intraveineuse de virus, des vésicules se forment, au bout de 24 heures, [illegible] scarifications faites aux points de pré

dilection du virus. NICOLESCO, SARONI & CALINESCU, nous l'avons signalé précédemment, observent, dans les mêmes conditions, la fixation du virus dans le liquide des phlyctènes obtenues par brûlure de la peau.

Les complexes sont titrés sur cobayes, par 6 à 8 piqûres intradermiques, au niveau du métatarse droit.

L'évolution vaccinale pure, chez le cobaye, consiste en l'apparition, à la fin du 2ème ou au début du 7ème jour, de petites vésicules au niveau des points d'inoculation, le membre se tuméfie, les vésicules confluent et arrivent à recouvrir toute la surface plantaire du cobaye, le prurit est vif. L'éruption sèche vers le 7ème jour et de grosses croûtes se forment.

L'évolution aphteuse pure chez le cobaye est classique : aphtes primaires en 24 heures et généralisation entre le 4ème et le 8ème jour. Il n'y a, contrairement à l'évolution vaccinale, ni tuméfaction, ni prurit, ni croûtes.

L'inoculation des complexes vaccino-aphteux, chez le cobaye, peut déterminer toutes les manifestations, depuis l'évolution vaccinale normale jusqu'à l'évolution aphteuse, en passant par l'évolution vaccinale avortée : c'est la preuve de la présence des deux virus. Les variations des évolutions dépendent de la virulence de l'élément aphteux.

L'inoculation des complexes "directs" ou "indirects" aux bovins provoque des éruptions spéciales, car l'évolution des lésions aphteuses est gênée par la présence du virus vaccinal. La virulence du virus aphteux dans les complexes s'atténue au cours des passages successifs ; cette atténuation peut être fixée par passages sur bovins, si le rapport des surfaces inoculées avec les pulpes vaccinales et les pulpes vaccino-aphteuses est convenable.

Le virus aphteux paraît survivre faiblement dans les régions où il est inoculé, il s'y ajoute la fixation d'une quantité variable de virus de généralisation. Cette quantité paraît être fonction d'un certain état d'immunité locale : les complexes "directs" sont, en effet, souvent moins riches en virus aphteux que les complexes "indirects".

Des dilutions de pulpe au 1/8, après de nombreux passages, provoquent toujours une fièvre aphteuse grave et généralisée.

Plus récemment, [illegible] (19[illegible]) a apporté des précisions sur la [illegible] du virus aux points [illegible] en quantité et qualité. Il s'agit [illegible] le nombre de repiquages n'est pas [illegible] par l'[illegible] virus aphteux [illegible] bovins, montrant [illegible]. La [illegible] de la [illegible] [illegible].

[illegible] vaccino-aphteux [illegible]
[illegible]
[illegible] physiologique et de glycérine.

A. BELIN a pensé utiliser ses complexes vaccino-aphteux, soit tels quels (1925), soit formolé[illegible] comme vaccin. Il cite de nombreux exemples favorables [illegible] fait actuellement l'objet d'une enquête de la part d'une Commission nommée par le Ministre de l'Agriculture.

Au point de vue qui nous intéresse, celui de la culture, nous avons vu qu'elle est satisfaisante. [illegible] cette culture est impure, le virus aphteux est mélangé au virus vaccinal. L'interaction des deux virus provoque une atténuation du virus aphteux au cours des passages [illegible] ble donc irrégulière et difficile à fixer dans sa virulence.

x x

L'utilisation des bovins, animaux de choix, mais peu maniables, trop onéreux, dispensateurs si parcimonieux de virus, d'une contagiosité redoutable, ont [illegible]
les cultures sur d'autres espèces domestiques.

[illegible]

[illegible] (19[illegible]), [illegible] [illegible] le virus aphteux [illegible] chez le porcelet. [illegible] ne pouvaient garder la [illegible] constamment s'en procurer [illegible] l'épidémie. La [illegible] de 5 à 6 semaines (15 à [illegible]) [illegible] réel de culture. Le [illegible] de 2 à 3 jours, puis la [illegible] caractéristiques (foyers jaunes du coeur) [illegible] inoculation de doses de 1/25 à 1/10 cc. [illegible] La culture consi[illegible]

colte de la lymphe des vésicules aphteuses. Il y avait multiplication du virus puisque la souche a été conservée pendant 2 ans. HECKER (Congrès de Bade, 1899) prouve le renforcement de la virulence par le passage de la lymphe sur le porc, cependant si LOEFFLER (Congrès de Bade, 1899) observe, lui aussi, l'accentuation de la virulence chez les porcs, il remarque son irrégularité car "la lymphe est aussi parfois peu virulente". De fait, il conserva sa souche de lymphe en transmettant le virus réciproquement du bovin au porc. La race des porcs est, selon les auteurs, importante à considérer, la meilleure a été la "Yorkshire". Par économie, après le prélèvement de la lymphe, les porcs recevaient 10 cc de sérum de cheval immunisé avec des doses croissantes de lymphe (1) la guérison des porcs était rapide et les pertes très rares.

NOCARD, ROUX, VALLEE & CARRE, dans un résumé d'expériences (1901-1921), à l'Académie des Sciences, sur la fièvre aphteuse, écrivent : "Devant l'impossibilité éprouvée par tous les chercheurs "d'obtenir l'agent spécifique en culture pure, chacun s'est efforcé d'entretenir le virus aphteux par passages successifs chez les "espèces sensibles, d'un virus recueilli sur le boeuf." Ils adoptent la culture <u>in vivo</u> et, comme LOEFFLER & FROSCH, ils utilisent, dans ce but, le porcelet comme producteur de virus en vue d'obtenir un virus d'activité extrême.

LECLAINCHE & VALLEE, au IXème Congrès International de Médecine Vétérinaire à La Haye (1909), apportent de nouvelles précisions. Le rendement de la culture est amélioré par les inoculations intraveineuses et intramusculaires de virus. La récolte consiste en un exsudat péricardique limpide, plus ou moins abondant (5 à 30 cm3), très virulent (même dilué au 1/1.000) qui renferme le virus à l'état de pureté et, par ailleurs, en de nombreux aphtes. A l'aide de passages successifs sur porcelet, ils obtiennent un virus d'activité croissante qui, au 20ème passage, tue, par injection intraveineuse, le porcelet en 40 à 60 h., à la dose de 1/100 cc. Ils ont ainsi tenté d'obtenir un virus fixe, c'est-à-dire une culture toujours identique dans ses caractères biologiques, base indispensable aux travaux ultérieurs. Mais NOCARD, ROUX, VALLEE, CARRE précisent les imperfections du procédé, la quantité de virus obtenue est limitée : "la souche est de bien "faible débit", même complétée par l'utilisation de broyage de débris épidermiques ou épithélium d'aphtes fraîchement rupturés,

---

(1) LOEFFLER, FROSCH & UHLENHUT signalent que le sérum de cheval ainsi obtenu immunisait très bien les porcs et les moutons mais non les boeufs (rapport 1901-1902

[illegible]

fiées mis en oeuvre pour en améliorer le rendement. En nombre de cas, faute d'individus sensibles, la série des passages se trouve interrompue, en d'autres, le virus paraît subitement perdre sa virulence.

[illegible] les passages sur le porcelet déterminent, à la longue, une atténuation du virus. VALLEE & CARRE (1922) résument leurs travaux sur le porc par cette phrase pessimiste : "... et nous avons conscience d'avoir perdu "jadis un temps précieux en ces recherches sur le por- [illegible] du pouvoir pathogène du virus aphteux lors des premiers passages sur le porc. Un virus aphteux non pathogène pour le cobaye le devient par passage sur le porc.

Aphtes artificiels

FRENKEL, en 1933 et 1934, tente de cultiver le virus aphteux en produisant des aphtes avec l'onguent de cantharide. Il infecte la région, soit avant, soit en [illegible] l'application de l'onguent. Il a étudié la possibilité d'obtenir la formation de virus aphteux, en plus des lieux de prédilection du virus, sur la peau de porcs et de porcelets en créant, artificiellement, [illegible] par l'onguent de cantharide. C'est dans le même ordre d'idée que [illegible] (1925) avaient déjà [illegible] au niveau des vésicules provoquées par des brûlures de la peau, après injection intraveineuse de virus.

FRENKEL obtient le même résultat avec les aphtes [illegible] après injection intraveineuse ou sous-cutanée de virus aphteux. Le virus est décelable, à concentration assez élevée, dans le liquide des [illegible] l'injection intraveineuse le virus est décelé plus tôt dans les vésicules artificielles que dans les aphtes spontanés. Le con- [illegible] artificielles est en rapport avec celui du sang. FRENKEL pense que le sang [illegible] généralement. Il a obtenu des concentrations de virus dans le sang qui [illegible] 1/50.000. Ces faits [illegible] que le virus est véhiculé et déposé par le sang dans les vésicules artificielles, mais comme la concentration de virus dans les aphtes est beaucoup plus élevée que celle du sang, FRENKEL admet une formation

[illegible] virus à leur niveau. La richesse en virus des vésicules cantharidiennes, quoique assez élevée, est inférieure à celle des aphtes naturels. [illegible]

Par inoculation intradermique, [illegible] des vésicules cantharidiennes est supérieure à celle du sang, et son apparition [illegible] [illegible]tion. Le virus s'élimine plus rapidement du sang lors de la [illegible]mation d'aphtes artificiels.

Des travaux ultérieurs (1937) de FRENKEL & VAN WAVEREN ont trait à l'influence des vésicules cantharidiennes sur la forma[illegible] [illegible]

Si les aphtes artificiels sont formés 24 à 48 heures avant l'éruption [illegible] chez le porc et le cobaye. Une immunité solide s'observe [illegible] [illegible] cette méthode donne une récolte plus abondante de virus ; il a vu, en effet, que le développement des aphtes aux lieux de prédilection était entravé.

Dans ses expériences témoins, la formation des aphtes et la [illegible] mine une nécrose lente à guérir. L'onguent de canthari[illegible] produit d'aphtes nets.

[illegible]

[illegible]

[illegible] après plusieurs fois de suite ; [illegible] d'une virulence [illegible] [illegible]itution d'une lésion géa[illegible] très virulent (pustule [illegible] [illegible] essais de VALLÉE [illegible]

lymphe [illegible] dans 300 à 500 [illegible] physiologique. [illegible] injectée sous la peau du thorax [illegible] d'un agneau ou d'un [illegible]. Lors de l'infection aphteuse, il ne se produit pas d'oedème, contrairement à ce que l'on observe dans le cas de la clavelée.

[illegible]

Reprenant, en 1929, cette idée, [illegible] et Mademoiselle CORDIER recherchent s'il [illegible] obtenir le développement du virus aphteux [illegible] nappe oedémateuse que constitue, chez les [illegible], la pustule claveleuse [illegible] (pustule de [illegible]).

Ils suivent la technique classique d'inoculation du virus claveleux dans le tissu conjonctif sous-cutané [illegible]. 48 h. plus tard, ils injectent aseptiquement 3 à 5 cc. de sérum aphteux [illegible] la pustule [illegible] d'un seul côté [illegible] en plusieurs points [illegible] de la nappe oedémateuse. Le [illegible] sur [illegible] dienes de cobayes, 24 à 30 h. après l'inoculation virulente dans le coussinet plantaire.

L'évolution de la clavelée poursuit son [illegible] normal non influencé par la fièvre aphteuse. De 24 à [illegible] h. après l'infection aphteuse, des prélèvements de lymphe étaient pratiqués des deux côtés des pustules claveleuses (du côté opposé aux inoculations du sérum virulent pour celles infectées). Cette lymphe était titrée comparativement avec du sang recueilli à la même heure dans la veine jugulaire.

Leurs conclusions sont les suivantes :

1) la présence du virus [illegible] tion normale de la pu[illegible] 300 à 1200 gr. de [illegible]

2) le virus aphteux se développe dans les pustules cla[illegible]s inoculées ou non de virus aphteux,

3) la virulence de la lymphe est décelable par in[illegible]lation au cobaye après dilution au 1/100 et même au 1/300,

[illegible] heure.

c) la virulence aphteuse du sang, celle de la lymphe et de la pustule ne sont pas parallèles ; le pouvoir infectant de la lymphe n'est donc pas le fait de la présence du sang qu'elle peut contenir.

D'autres techniques d'inoculation du virus aphteux : infection des pustules par filtrat obtenu en partant d'un broyage d'aphtes, inoculation du sérum virulent dans la muqueuse buccale, dans le derme des plis sous-caudaux, n'ont pas donné de résultats favorables. En résumé, les virus aphteux et claveleux peuvent se développer simultanément chez le même animal, l'oedème claveleux se révélant comme un milieu favorable à la multiplication du virus aphteux.

Mademoiselle CORDIER, en 1940, a renouvelé ces expériences, en a confirmé les principaux résultats et a noté quelques variations. L'évolution de la pustule claveleuse n'est pas troublée, la pustule non ensemencée et le sang n'ont été virulents que dans deux essais sur quatre. La pustule ensemencée crée des aphtes après dilutions du 1/1000 au 1/8000 (1/20 de l, selon les agneaux. Il y a une culture du virus aphteux au sein d'une autre culture vivante. Le sang n'intervient pas car il a une virulence plus faible et à des moments différents. Mademoiselle CORDIER a prouvé que le virus aphteux ainsi préparé conservait ses propriétés d'être adsorbé sur de la poudre de carbone animal. De plus, le virus claveleux dans l'état de symbiose est également adsorbable. Il n'est pas gênant dans les expériences d'inoculation sur bovin, celui-ci étant réfractaire à la clavelée. Réciproquement, la présence du virus aphteux dans le complexe vaccinal contre la clavelée est en dose insuffisante pour créer la fièvre aphteuse.

Oedème provoqué par l'huile de croton

RINJARD et Mademoiselle CORDIER (1929) se sont demandé si le virus claveleux jouait un rôle pour faciliter le développement du virus aphteux ou si, tout simplement, celui-ci trouvait un milieu favorable dans l'oedème provoqué par le virus. Ils ont repris l'idée de VALLEE de provoquer un oedème aseptique par l'inoculation, dans le tissu conjonctif sous-cutané, d'eau physiologique stérile dans laquelle ils ont additionné de l'huile de *Croton tiglium*. 24 h. après un oedème [illegible] qui commence à se résorber après 48 h. Dans cet oedème [illegible], VALLEE & RINJARD avaient précédemment inoculé, sans succès, des pulpes et des sérosités aseptiques, à l'aide de filtrats obtenus en partant de broyage d'aphtes. RINJARD & Mademoiselle CORDIER ont inoculé du sérum aphteux recueilli aseptiquement par [illegible]

[illegible] d'un mouton. Les auteurs ont injecté, du côté droit : tous les [illegible]

en hauteur et largeur 5 cm. d'un mélange de 100 cc. de sérum physiologique stérile, 4 gouttes d'huile de croton, 5 cc. de sérum aphteux de cobaye, 0,20 gr. de novocaïne (pour tempérer la douleur) ; au côté gauche : 100 cc. de sérum physiologique, novocaïne et 4 gouttes d'huile de croton. A la 24ème heure, du sang et de la lymphe prélevés des deux côtés du thorax sont titrés sur 5 cobayes : seule la lymphe du côté ayant reçu du sérum aphteux est virulente. A la 48ème heure le mouton est sacrifié, les fragments d'oedème sont prélevés, broyés séparément au Latapie ; le broyat est dilué au 1/4, au 1/400 et au 1/2000 dans de l'eau physiologique stérile et titré sur cobayes. Le sang est virulent. L'oedème du côté droit inoculé est beaucoup plus riche (dilutions au 1/4 : 5 cobayes positifs sur 5, au 1/400 : 4 sur 5, au 1/2000 : 1 sur 5) que celui du côté gauche (1/4 : 5 positifs sur 5, tous les autres sont négatifs).

Le virus aphteux se développe donc facilement dans un oedème provoqué par une substance irritante comme l'huile de croton. Il est décelable plus vite dans l'oedème du côté inoculé que dans le sang circulant, il est plus riche en virus que l'oedème du côté opposé, non inoculé, mais ensemencé par l'intermédiaire du sang circulant.

FRENKEL ne croit pas à une culture du virus dans le tissu conjonctif sous-cutané, le virus ne se développe pas dans le tissu mésenchymateux, comme ses expériences _in vitro_ le lui ont montré, il pense que la teneur en virus doit être attribuée à une accumulation de virus produite après la généralisation par la voie sanguine.

Ces expériences, d'un grand intérêt, permettent d'[illegible] [illegible] aphteux pur. Elles mériteraient d'être [illegible] et des virus d'origine bovine.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

technique d'inoculation au cobaye par scarification de la surface plantaire du métatarse avec production locale d'aphtes puis généralisation de la maladie, avec apparition de vésicules secondaires sur le coussinet des pattes postérieures, de la langue et des lèvres. Ils montrent la possibilité de passage de la maladie en série sur cet animal pendant une période indéfinie. Leurs travaux, puis ceux d'UHLENHUT (1921), d'[illegible] (192[illegible]), [illegible] (1922), ARKWRIGHT & BURBURY (1925), [illegible] (1925) ont permis de mettre au point une technique qui provoque, à coup sûr, l'infection, avec une évolution identique, s'il s'agit d'une souche adaptée au cobaye.

L'inoculation par voie intradermique dans le coussinet plantaire d'1/4 cc. de lymphe ou filtrat de broyage d'aphtes dilué souvent jusqu'au 1/1.000.000, déclenche, 16 à 24 h. après, l'apparition de petites vésicules se réunissant en un aphte dit primaire dans la région inoculée ; vers la 30ème heure le sang est virulent et, en 48 h., le coussinet plantaire non inoculé présente un aphte dit secondaire : l'infection est généralisée ; le 5ème jour des aphtes apparaissent sur la langue, la muqueuse buccale, les lèvres et le bord des gencives.

Malgré d'innombrables passages sur le cobaye, WALDMANN & TRAUTWEIN n'ont pas obtenu un virus profondément modifié (pour le cobaye). Le cobaye offre xx l'intérêt primordial de ne pas s'infecter par contact, aucun exemple n'est signalé, malgré le nombre considérable de cobayes utilisés dans l'étude du virus aphteux (1).

Des lésions de brûlure des coussinets plantaires simulent des aphtes. Nous avons eu, avec Léone [illegible], l'occasion d'en observer des exemples, à la suite de désinfection des cages par des solutions de crésyl. Le passage de la sérosité aux cobayes a éliminé toute suspicion de fièvre aphteuse.

Cobayes entiers

VALLEE, CARRE & RINJARD (1928) ont pensé qu'à la phase septicémique la totalité du cobaye est [illegible] importante de virus. Ils considèrent la masse entière de l'animal comme une culture vivante. Le cobaye est supérieur aux autres espèces animales car, nous l'avons vu, l'évolution est régulière. Au moment où le sang est virulent (1/5.000 - Commission anglaise), l'organisme l'est naturellement en sa totalité.

---

(1) Expérimentalement GALLOWAY a vérifié ce fait (4ème rapport p. 302-305, App. III) et n'a pu provoquer une infection par contact chez 30 p. 100 de cobayes que par des artifices de provocation : atmosphère de poudre de quartz ou de silice, renouvellement [illegible] des cobayes infectants. Les 30 p. 100 de co[illegible] tact ont présenté des lésions du 5ème au 2[illegible].

Pratiquement les cobayes sont inoculés avec une souche bien adaptée par passage récent (virus O). Ils sont sacrifiés entre 24 et 30 heures après leur inoculation. La peau, la masse intestinale, la vésicule biliaire, la vessie et les os sont éliminés. Le reste du cadavre est trituré soigneusement à l'appareil Latapie.

La quantité moyenne de pulpe obtenue est d'environ 60 gr. pour un cobaye de 400 gr. Le broyage dilué en eau physiologique (0,9 ‰, 300 cc.) est très riche en virus ; un cobaye de 500 gr. est capable de fournir assez de virus pour préparer un vaccin formolé (3 p. 1.000 de formol - 48 h. à 20°) suffisant pour immuniser 20 boeufs. DONATIEN et LESTOQUARD, puis Mademoiselle CORDIER ont confirmé ces faits. D'autres auteurs n'ont pas réussi. "Affaire, sans "doute", écrit VALLÉE, "d'adaptation au cobaye des virus "utilisés et sans doute aussi conditions différentes d'ex-"ploitation d'une technique dont les détails peuvent varier "à l'extrême." Quoiqu'il en soit, le cobaye reste un bien discret producteur de virus aphteux, ses aphtes plantaires sont insuffisants et [illegible] paraissent pauvres en virus.

Le virus adapté au cobaye perd certainement ses qualités pathogènes et immunisantes à l'égard des bovidés.

Adaptation des virus aphteux au cobaye :

L'adaptation des virus bovins au cobaye ne se fait pas sans difficulté, l'infection, lors des premiers passages, n'est pas toujours obtenue. Notre regretté Directeur RINJARD a vérifié le fait expérimentalement ; il a montré que les aphtes bovins conservés dans le milieu conservateur à pH 7,6, depuis moins de 5 jours, n'infectent que les 2/3 des cobayes inoculés. Quelquefois, au cours des premiers passages, le virus perd ses qualités pathogènes, même pour le cobaye. RINJARD admet la faible valeur pathogène [illegible] mais il insiste aussi sur la non-réceptivité [illegible]

Au cours de sa scrupuleuse vie scientifique, RINJARD a noté, à chaque passage de virus aphteux, une certaine proportion de cobayes sans lésions. Il a tenté de nombreux essais d'affaiblissement de la résistance naturelle des cobayes au moment de l'inoculation ; il s'est fixé sur la sensibilisation du cobaye aux albumines bovines. Il provoque cet état anaphylactique par l'injection intrapéritonéale de 0,1 cc. de sérum de bovidé chauffé à 58-60° et [illegible] du virus seulement 14 à 15 jours après. Ses [illegible] par comparaison avec des

témoins neufs, la sensibilité des cobayes anaphylactisés est plus grande, le virus bovin faiblement actif provoque des aphtes primaires en 25 h. chez les cobayes sensibilisés, rien chez les témoins, les passages ultérieurs ne réussissent que sur les cobayes sensibilisés.

Ces résultats ont été confirmés et appliqués dans tous les laboratoires étrangers s'intéressant à la fièvre aphteuse.

Extension des lésions aphteuses chez le cobaye :

H.G. MAITLAND ([illegible]) a fait, chez le cobaye, des essais d'extension des lésions de fièvre aphteuse localisées dans certaines parties de la peau et des muqueuses.

C'est ainsi que l'auteur a essayé, sans succès, pour la culture du virus, la greffe du coussinet plantaire sur une autre partie du corps. La peau velue greffée à la place du coussinet plantaire enlevé développe des vésicules quand le virus aphteux est inoculé par voie intradermique ou intramusculaire, bien que des lésions sur la peau velue soient très rarement observées. Des vésicules sont produites dans des régions généralement non affectées en soumettant ces régions à une irritation de pression. La fixation des pattes de derrière, afin que l'animal ne puisse marcher ou se reposer sur elles, empêche nettement le développement du virus dans les coussinets plantaires et évite le développement des lésions à leur niveau quand le cobaye est infecté par inoculation intramusculaire avec une forte dose de virus aphteux.

Le virus ne semble pas se propager dans le muscle. L'auteur signale qu'il faut broyer le muscle dans une solution fortement tamponnée pour garder un pH constant, car le broyage provoque une acidification.

Chez les cobayes infectés de fièvre aphteuse, le virus a été trouvé dans la trachée, les poumons, le foie, la rate et les reins, mais pas dans le muscle squelettique. Le sang présent dans les tissus contient du virus et peut influencer la quantité de virus trouvée dans les organes. D'autre part, la solution tamponnée ne maintient peut-être pas un pH favorable au virus.

<u>Testicule</u> :

Les travaux de [illegible] ([illegible]), [illegible] (192[illegible]), LEVADITI, NICOLAU et GALLOWAY (1926) ont montré le passage du virus aphteux par voie intratesticulaire. VAN [illegible] a essayé de provoquer une orchite aphteuse par injection de virus dans les testicules.

Chez le cobaye, l'injection de virus filtré est suivie de l'évolution de la fièvre aphteuse sans généralisation mais sans inflammation locale ni grossissement du testicule. Au bout du 2ème passage le virus disparait déjà. Des artifices d'inoculation par injection de bouillon dans les testicules ou extirpation de la rate

sur de très jeunes cobayes ne sont pas suivis d'orchite.
Les essais sur le lapin ont été négatifs.

Liquide amniotique :

ARAMBURU (1947) de l'Institut National de la Fièvre aphteuse d'Argentine a pensé que le liquide amniotique pouvait être un milieu approprié pour la multiplication du virus. Les virus O ou C, de passage récent sur cobayes sont virulents après dilution au 1/3.000.000 ; ils provoquent une infection généralisée en 48 à 72 h. Les cobayes sont utilisés au bout de 35 à 50 jours de gestation, la quantité de liquide amniotique par sac amniotique est faible : 2 à 5 cc. L'animal est sacrifié au moment opportun, par une large laparatomie le liquide amniotique est aspiré à la seringue. Il est titré, soit frais, soit après la précipitation à l'acétone préconisée par PYL pour le sérum sanguin. L'auteur conclut qu'il a mis en évidence le virus aphteux chez les cobayes infectés depuis 24, 48 et 72 h., mais pas après. Le pH, mesuré au potentiomètre, est de 7,12 pour le liquide amniotique normal et de 7,48 pour celui du cobaye infecté. Ces valeurs autorisent la survie du virus. Ces travaux sont à reprendre chez les bovins ; en effet, cette méthode de culture ne peut être retenue chez le cobaye, étant donné sa trop faible quantité de liquide amniotique.

Culture en sacs de collodion

En 1899, HECKER, au Congrès de Médecine Vétérinaire de Bade, expose ses tentatives de "culture in vivo du "contage" chez cobayes et lapins, inspirées, dit-il, "des beaux travaux sur la péripneumonie publiés par "Monsieur NOCARD". Il introduit des capsules de collodion contenant une dissolution de chlorure de sodium physiologique ou d'un autre milieu de culture mêlé de sérosité aphteuse ou de l'agent virulent filtré, dans la cavité abdominale des animaux. Selon NOCARD, les sacs de collodion protègent contre la phagocytose les êtres vivants qui pullulent à leur intérieur. Après un séjour de 3,5,7 jours et plus, le contenu des sacs se trouble légèrement. L'examen microscopique d'un sac retiré au bout de 5 jours démontre la présence des corpuscules réfringents, semblables à ceux trouvés par NOCARD dans ses expériences sur la péripneumonie, ils n'existaient pas dans des sacs témoins sans matière virulente. HECKER estime qu'il ne s'agit pas du virus aphteux. Le contenu d'une capsule fut trouvé faiblement virulent à l'expérimentation. Plusieurs fois HECKER observe, après l'intro-

duction des capsules de collodion, ... [illegible] ... qu'il ne peut [illegible] [illegible] [illegible] provoque la fièvre aphteuse chez un cobaye.

Ces essais ont été [illegible] par [illegible] CALDERON, en 1913-1914, [illegible]. Des sacs de collodion remplis [illegible] sont introduits dans la cavité péritonéale d'un porcelet. Celui-ci est sacrifié au bout de 4 jours, le contenu du sac inoculé, par voie intradermique, à un veau, ne produit qu'une légère ascension thermique le soir de l'inoculation.

[illegible] sérum de poule chauffé) et chez le lapin (lymphe aphteuse filtrée [illegible] résultats. Le virus en sac de collodion introduit dans le péritoine du porcelet, de la poule ou du lapin, est donc détruit en moins de 4 jours.

Les mêmes auteurs ont essayé un autre procédé de culture : des bougies Chamberland stérilisées sont remplies d'un mélange de lym- [illegible] sont fermées par un bouchon de caoutchouc recouvert de collodion et introduites dans la cavité péritonéale de lapins et de veaux. [illegible] fait une maladie sévère après deux jours d'incubation. Le contenu [illegible] est ensemencée avec le contenu de la première et introduite dans le péritoine d'une génisse neuve ; celle-ci fait une fièvre aphteuse sévère. Y a-t-il réellement multiplication ? seuls de nombreux passages pourraient fixer sur ce point.

Culture sur tumeur greffée

Une tentative de culture *in vivo* en grande quantité de virus pur et d'une activité connue et considérable a été faite par BARDACH (1946).

Elle part du principe selon lequel les ultra-virus ont une électivité marquée pour les cellules en [illegible] Il suffit de s'adresser à des animaux de laboratoire sensibles au virus que l'on veut multiplier. Ainsi LEVADITI et ses collaborateurs, et Mademoiselle SCHOEN ont réalisé la culture [illegible] mitose, dans les néoplasmes. [illegible] que le virus aphteux était doué [illegible] lules néoplasiques.

Il a expérimenté sur le lymphosarcome de [illegible], une des rares tumeurs greffables au cobaye. Le poids de la tumeur greffée peut atteindre une centaine de grammes. Le virus [illegible] inoculé dans un des coussinets plantaires est retrouvé régulièrement et [illegible] dans la tumeur située loin du point d'inoculation. La virulence du tissu tumoral (300.000 doses infectantes par gramme) est au moins égale et souvent supérieure à celle des lambeaux d'aphtes recueillis sur le même cobaye ; elle peut exister même en l'absence de généralisation. Cette virulence n'est pas due au sang circulant puisqu'elle lui est supérieure et existe à des moments où le sang n'est pas virulent. Autre preuve, une tumeur broyée finement, mise en suspension dans un liquide physiologique [illegible] fois, le virus est dilué au taux de 10^{-12}, donc bien supérieur au seuil infectant 10^{-6} et cependant dans les fins fragments de tissu, il reste encore des quantités décelables de virus.

La tumeur prélevée après le sacrifice du cobaye représente une source abondante de virus. La virulence de fragments en boite de Pétri persiste 10 à 15 jours, à 0°. Une suspension de tissu broyé au quartz en liquide conservateur [illegible] garde sa virulence plusieurs mois à 0°. Les virus, types O et A, se comportent de façon identique.

L'étude du pouvoir pathogène du tissu [illegible] a été poursuivie par BRIDRÉ & BARDACH. Les tumeurs sont broyées [illegible] quartz pulvérisé. Le broyage est dilué au 1/100 en eau physiologique tamponnée à pH 7,6. La période la plus favorable pour le prélèvement [illegible] après l'inoculation de 0,25 cc. de virus dans le coussinet [illegible] n'a pas d'influence sur la virulence du tissu, par contre les tumeurs à croissance rapide et les parties périphériques bien vivantes sont plus riches [illegible]

[illegible] virulente [illegible] pratiquement [illegible] recommandé que l' [illegible] qui permet de suivre [illegible] de la tumeur si des [illegible] hasard, la suspension in- [illegible]

[illegible]

[illegible] pour le cobaye, ce qui représente [illegible] infectantes par gramme de tissu. [illegible] et même de 1/1.000.000 sont atteints. [illegible] des lésions [illegible] pour les [illegible] sur trois.

Le virus [illegible] et de la chaleur [illegible] à 10 p. 100 en milieu conservateur (mélange à parties égales d'eau physiologique phosphatée et de glycérine).

[illegible] ont [illegible] que, [illegible] conditions, (virus à 3 p. 100, en eau physiologique tamponnée, formol à [illegible] p. 1.000, 7 jours à 20-23°, avec agitation quotidienne) [illegible] virus avait un pouvoir antigénique chez les bovidés (expérience [illegible] vaches résistantes à l'infection par contact 19 jours après [illegible] vaccination).

Enfin, ce virus de culture sur cobaye a permis à RINJARD, [illegible] de préparer un sérum [illegible] par hyperimmunisation de bovins. Ce sérum prévient la généralisation [illegible] du cobaye à la dose de 1/2 cc. chez le cobaye de 400 gr. [illegible] sérums sont actifs [illegible] alors que, [illegible] les mêmes conditions, le sérum de bovins simplement guéris [illegible] fièvre aphteuse, n'est actif qu'à des doses de 2 à 4 cc.

Sur la base de ces expériences [illegible] ont [illegible] d'utiliser [illegible] de bovins. L'intérêt [illegible] réalisation, est d'utiliser un virus bovin [illegible] épithéliale dont la transmission est facile et le [illegible].

[illegible]

[illegible] confirmée exp[illegible]

[illegible] tiennent [illegible]. Les [illegible] articulaires et [illegible] résultats [illegible] matériel virulent consistait en sang défibriné de [illegible] aphteuse filtrée.

[illegible]

de l'oeil d'un lapin, 2ème passage, injectées par voie intradermique. Il est regrettable que la guerre 1914-1918 ait interrompu ces expériences intéressantes.

La réceptivité du lapin a été prouvée et étudiée par les recherches de HOBMAIER (1921), NICOLAU & GALLOWAY [illegible] GALLOWAY & NICOLAU (1927), BEDSON, MAITLAND & BURBURY (1927).

Culture dans le poumon de lapin :

GIROUD & JEZIERSKI, en 1947, essayent la culture *in vivo* du virus aphteux, type O, sur 23 lapins. Le virus de départ consiste en aphtes plantaires de cobaye, broyés et dilués dans un tampon phosphaté, filtrés ou non. Le virus provenant d'un cobaye est mis en suspension dans 2 cc. de liquide. 2 à 10 cc. sont inoculés par voie trachéale à des lapins de 200 à 2.000 grammes, conservés à 37°, 20° et 3°. Les lapins ont une période d'hyperthermie (40° et plus) suivie d'une phase d'hypothermie (37° à 28°). Au 4ème ou au 5ème jour, les poumons (17 gr. en moyenne) oedématiés ou hépatisés en partie sont prélevés, broyés et dilués dans la proportion d'un poumon pour 30 cc. de liquide tampon. L'inoculation dans le coussinet plantaire de cobaye provoque une fièvre aphteuse généralisée. 5 passages poumon-poumon (4 gr. dans 10 cc.) sont réalisés avec succès chez le lapin.

Le mélange de rickettsies du typhus épidémique et du virus aphteux O inoculé par voie pulmonaire chez le lapin est intéressant au point de vue théorique. Il n'apporte pas de résultat pratique de culture plus important. Le passage du virus aphteux a été réalisé 5 fois, alors que les rickettsies disparaissent à l'examen microscopique.

Une 3ème méthode d'inoculation a été pratiquée par ces auteurs. 2 cc. de virus inoculés dans un tissu dont la circulation sanguine a été modifiée peut provoquer des sérosités atteignant 40 à 120 gr. chez un lapin de 2.000 gr. La technique n'est malheureusement pas indiquée. Les expériences ont été faites sur 131 lapins et les titrages sur cobayes. Les auteurs prouvent la culture de la façon suivante : 1 à 2 cc. de virus de cobaye actif au 1/100.000 inoculés au lapin, produisent 60 à 120 cc. de sérosité virulente au 1/10.000. Il y a donc une multiplication de 10 fois.

[illegible] passages alternés sur lapins - cobayes. Il provoque la fièvre aphteuse typique chez le mouton ; son pouvoir pathogène a été étudié en 1946 sur les souris (voie

..le positive), le rat (toutes voies négatives), les cobayes (voie ..achéale positive), le lapin (voie intracutanée positive), le ... et surtout les chatons (voie intratrachéale positive), le ... (voie intracutanée positive), le coq (1 positif sur 2 par voie ..cutanée à la face antérieure de l'aile), le canari (négatif), .. singe (1 Cynocéphale négatif par voie intradermique). La culture .. la voie pulmonaire semble peu productrice (17 gr.), par contre, .. la sérosité, la récolte (60 à 120 gr.) correspond à la quantité obtenue par 1 à 2 vaches.

Ces résultats apportent une nouvelle méthode de production, ais il est [illegible] ..s inconvénients que les passages sur cobayes, c'est-à-dire une atténuation du pouvoir pathogène et antigénique du virus pour les bovins. C'est pour répondre, en partie, à cette objection que ..ROUD & JEZIERSKI ont recherché le pouvoir vaccinant de la sérosité formolée à 1 p. 1.000 mélangée à l'hydroxyde d'aluminium. Les expériences faites sur un nombre limité de cobayes et de moutons ont montré que le pouvoir antigénique du virus contenu dans la sérosité du lapin est conservé. Ces expériences mériteraient d'être reprises sur un plus grand nombre d'animaux et, en particulier, sur bovins.

Culture dans le cerveau :

Plusieurs expérimentateurs ont voulu transformer le dermotropisme étroit du virus aphteux en un virus à tendance neurotrope. Les essais de culture dans le cerveau sont dirigés dans le but d'obtenir une multiplication du virus et, secondairement, une souche modifiée, vaccinante, virulente mais inoffensive, comme STEPHANOPOULOS l'a démontré, par exemple, pour le virus de la fièvre jaune. Les essais positifs ont réussi surtout chez la souris. Nous grouperons, dans ce paragraphe, les quelques tentatives faites chez le co.. le lapin et quelques autres espèces et qui ont eu des résultats heureux.

VAN WAVEREN, en 1933-1934, a inoculé, dans le cerveau de la souris blanche, le virus aphteux lavé à l'éther, il n'a pas obtenu d'éruption d'aphtes, mais le virus est resté virulent pendant 3 jours dans le cerveau et 24 heures dans le foie et la rate. 3 à 4 passages intracérébraux ont été réguliers mais sans adaptation spéciale au

NAGEL, à l'île de Riems, a réussi, en 1936-1937, au cours de 125 passages dans le cerveau de la souris blanche, à cultiver et à multiplier le virus de la fièvre aphteuse. Ce virus est profondément adapté d'une façon irréversible au 60ème passage, NAGEL le nomme le type S, il ne généralise plus, il reste localisé et se multiplie exclusivement dans le système nerveux central, sa virulence est alors

[illegible] jusqu'alors il était démontré (J. ET A. ARKWRIGHT, BURBURY, [illegible]) que la [illegible] intramusculaire du virus aphteux, le sang des souris inoculées n'est plus virulent 2, 3 et 4 jours après l'inoculation. Or, par l'injection intracérébrale, le virus reste vivant chez la souris sans, toutefois, provoquer, chez elle, une maladie cliniquement ou anatomiquement appréciable, pendant les premiers passages. Par la suite, il provoque le hérissement des poils, la parésie, la paralysie des membres postérieurs et la mort. Il reste hautement pathogène pour les autres espèces sensibles. NAGEL émet l'hypothèse de composants neurotropes conjointement aux composants dermotropes du virus aphteux.

Ces expériences sont poursuivies par HOFMANN qui, en 1941 et 1944, a réalisé 680 passages.

Au 140ème passage, l'incubation et l'évolution sont raccourcis, les souris meurent régulièrement avec les symptômes d'encéphalite et de paralysie des membres postérieurs. Le virus B augmente de virulence pour la souris, au 476ème passage une dilution de 1.10^{-12} injectée par voie intracérébrale provoque l'évolution de la maladie. Par contre, il faut atteindre une dilution de 1/1.000 pour infecter le cobaye par voie plantaire. HOFMANN en déduit l'affaiblissement du composant épithéliotrope à l'avantage des constituants neurotropes. NAGEL trouve ce phénomène réversible, le virus récupère ses propriétés dermotropes par passages ultérieurs sur le tissu plantaire du cobaye et, corrélativement, ce virus perd sa virulence par injection intracérébrale, intrapéritonéale ou sous-cutanée chez le cobaye. L'évolution n'est alors décelée que par une salivation exacerbée sans lésion épithéliale, cette réversibilité est fonction du nombre de passages sur la souris, le composant épithéliotrope diminue au fur et à mesure que s'accroît le nombre de [illegible] sur [illegible] neurotrope conserve ses qualités 14 mois si elle est placée dans une solution tamponnée de phosphate à pH 7,[illegible], à une température de + 3° à [illegible]

[illegible] ème passage, il a exposé [illegible]

[illegible] 7[illegible]0ème passage, le composant épithéliotrope est disparu. Par contre, le composant neurotrope est actif en dilution à 10^{-6} [illegible] à $10^{-[illegible]}$. [illegible] solution tamponnée, passée à + 2° [illegible] conservé 150 jours, il peut être [illegible] voie intrapéritonéale chez la souri[illegible]

par épreuve d'immunité croisée chez le cobaye, [illegible] a constaté que le type B neurotrope conserve ses propriétés immunisantes spécifiques. L'immunité provoquée est irrégulière, il faut plusieurs injections de virus pour consolider cette immunité. L'injection de sérum immunisant *in vivo* ne protège pas la souris, mais la neutralisation *in vitro* du virus est obtenue aussi bien avec le sérum immunisant B des cobayes qu'avec le sérum de souris immunisées. L'injection intracérébrale ou sous-cutanée du virus neurotrope d'origine murine, des 400 au 600ème passages, tue la plupart des cobayes sans signes spécifiques de fièvre aphteuse, sauf une forte salivation. Les survivants, ainsi que des cobayes ayant reçu simultanément le virus et du sérum immunisant B de cobayes, sont immunisés contre la souche B originelle. Le virus des passages postérieurs, au 600ème, n'immunise plus les cobayes. Un vaccin à base d'hydroxyde d'alumine et de virus neurotrope de passage protège les cobayes.

Le Professeur LEVADITI, avec la souche HOFMANN, confirme, en 1942, ces travaux précédents et entreprend quelques nouveaux essais au sujet de la virulence, de l'histopathologie et de la chimiothérapie.

Au 605ème passage, la dilution maximum est de 10^{-5} avec mortalité de 33 p. 100 à 100 p. 100, selon les expériences. Il est utilisé 0,2 cc. par voie [illegible], la mort a lieu entre 20 et 48 heures. Les lésions nerveuses sont d'une intensité inaccoutumée ; elles intéressent les substances grise et blanche et sont localisées surtout au cortex cérébral, à l'hippocampe, à la corne d'Ammon. Elles consistent en infiltration de polynucléaires caryolysés, lyse et [illegible] massives des neurones, vacuolisation de la substance de soutien, fonte totale [illegible] de la corne d'Ammon, [illegible] et méningite des septums.

Notons, à titre indicatif, qu'aucun résultat thérapeutique n'a été atteint avec [illegible] essais sur [illegible] de souris [illegible]).

Culture dans le cerveau de différentes espèces animales :

Nous venons de voir la possibilité d'entretenir une souche neurotrope chez la souris, [illegible] essais sur les autres espèces sont moins heureux.

En 19[illegible], LEVADITI, [illegible] et [illegible] ont observé la conservation du virus aphteux dans le cerveau du cobaye, après inoculation intraveineuse. Le virus est décelé pendant les 3 ou 4 jours qui suivent l'inoculation. L'année suivante, les mêmes auteurs ont introduit le virus directement dans l'encéphale. Chez le cobaye et le lapin les résultats sont peu encourageants : le virus se conserve quelques jours dans le cerveau du lapin, mais sans possibilité régulière [illegible]

[illegible] dans une expérience, 3 passages consécutifs ont été réalisés. Le premier lapin a fait de la fièvre et a maigri le 4ème jour ; il a été sa[illegible], paralysé du train postérieur, le [illegible] jour. L'in[jection] intradermique du broyat de cerveau a provoqué la fièvre aphteuse chez le cobaye. Un lapin sur [illegible], après injection intracérébrale et inhalations quotidiennes d'é[illegible]ther, a présenté, en trois jours, de la paralysie, la mort est survenue au bout de 8 jours. Les passages suivants sur cobaye ou lapin sont négatifs. Les auteurs se demandent si d'autres souches de virus aphteux donneraient les mêmes résultats.

Au Laboratoire National de Recherches d'Alfort, [illegible], en 1951, a repris ces expériences chez le cobaye avec plusieurs souches de virus aphteux bien adaptées à cette espèce : types C et A Vallée et C Riems, puis Rouen II [illegible] seulement récent (intermédiaire entre A et O). [illegible] sérum virulent de cobaye, par injection intracérébrale, provoque une fièvre aphteuse typique et généralisée chez 5 cobayes sur 6, le 6ème montre des accidents nerveux inhabituels dans la fièvre aphteuse. 3 passages de cerveau à cerveau, à partir de ce sujet, réussissent, mais les suivants, ainsi que les passages cerveau-coussinet plantaire, échouent ; il ne semble pas s'agir de manifestations du virus aphteux. Les essais d'apparition d'encéphalite aphteuse ont échoué avec toutes les souches de virus, même par les modes d'inoculation suivants : cobayes préalablement sensibilisés avec du sérum de boeuf (méthode KINJAMI), addition, au virus inoculé, de 2 mmgr. de bacilles tuberculeux avirulents d'origine équine (cheval VALLEE). Tous les cobayes font une fièvre aphteuse généralisée sans multiplication appréciable dans le névraxe.

VAN [illegible], en 1955, a tenté l'inoculation du virus aphteux dans le cerveau du cobaye, du lapin, du veau et du porcelet. Chez le lapin, elle n'a pas provoqué l'éruption d'aphtes ; mais si, chez les autres espèces animales, elle a provoqué la fièvre aphteuse, cette voie et plus irrégulière et moins efficace que l'injection intradermique, intraveineuse ou intramusculaire. L'encéphalite aphteuse n'a pu être réalisée ni chez le cobaye, ni chez le lapin, par les artifices d'inoculation suivants : injection intracérébrale [illegible] de virus aphteux et de vaccine (souche [illegible] [illegible] sur charbon ou levures, injection [illegible] bouillon, ou d'éther, dans [illegible] [illegible] animaux inoculés. Dans [illegible] [illegible] du cerveau en 24 h., [illegible]

Les inoculations dans la cornée, la chambre antérieure de l'oeil chez le cobaye et le porc, sont négatives. FRENKEL et VAN WAVEREN en 1938, n'obtiennent pas une immunité très sensible. [illegible], en 1937, considère que le système nerveux central du cobaye n'est pas propre à la multiplication du virus aphteux. JANSEN (1934) reprend l'inoculation intracérébrale du cobaye avec le virus aphteux type A; il obtient une fièvre aphteuse généralisée, mais 24 heures après l'injection de 0,1 cc. d'un mélange de 0,15 cc. de lymphe et de [illegible] cc. d'eau physiologique (soit environ 45%) le virus ne peut être décelé. Le broyage de ces cerveaux ne provoque plus la maladie chez les cobayes (voies intradermique et intracérébrale) et ceux-ci ne sont pas immunisés.

Pour FRENKEL et VAN WAVEREN (1938), le virus aphteux, par inoculation intracérébrale chez le veau et le porc, disparaît en 24 heures. Dans la majorité des cas cette inoculation n'est pas suivie d'aphtes et les animaux ne sont pas immunisés.

Conclusion :

La culture *in vivo* du virus aphteux est surtout intéressante chez l'espèce bovine. C'est son véritable milieu d'élection où le virus trouve les éléments de sa multiplication et de sa virulence optimale.

L'espèce bovine assure la persistance des souches dans leur spécificité et leur [illegible], base de toutes les recherches. A défaut d'autres cultures, l'inoculation de la langue des bovins est la méthode actuellement employée pour la production du virus, en vue de la fabrication industrielle des vaccins. La méthode de [illegible] de culture sur veau *in vivo* en symbiose avec le virus vaccinal est également intéressante, mais les autres procédés n'ont pas d'application pratique, soit que le rendement ou le titre est insuffisant ou irrégulier, soit que le pouvoir immunisant est sensiblement diminué pour les bovins.

On peut penser que la culture *in vivo* sur la langue des bovins, d'un prix de revient considérable avec un rendement médiocre, sera remplacée par des cultures *in vitro* nécessitant un bien moins grand nombre d'animaux ou par d'autres méthodes dont nous allons envisager les modalités.

b) Facteurs favorisant les cultures *in vivo* :

Il faut certainement rechercher des moyens susceptibles d'accroître la multiplication et le pouvoir pathogène du virus aphteux en culture *in vivo*. Mais tant que la nature et la culture du virus aphteux nous resteront, en grande partie, inconnues, l'étude de ces facteurs est très difficile.

Depuis PASTEUR, CHAMBERLAND & ROUX, on sait que les conditions de culture et l'addition de substances dans les milieux artificiels peuvent augmenter ou diminuer le pouvoir pathogène des microbes. La virulence d'un germe peut être exaltée par [illegible] très peu résistant puis par passages répétés à des animaux de moins en moins réceptifs, ou par passages alternés d'une espèce réceptive à une espèce non réceptive. Le lieu et le mode d'inoculation, la dose de produit virulent interviennent, sans aucun doute. L'association avec d'autres espèces microbiennes est souvent un facteur très favorable d'infection, ainsi que l'addition aux produits virulents de diverses substances : terre d'infusoires ([illegible], 1912), solution hypertonique de chlorure de sodium (OLITSKY & SCHLESINGER), glycérine ([illegible] 1942 - SMITH, 19[illegible]), hydroxilamine (YAMAFUSI & UEDA, 1950).

Les exo et endotoxines des germes visibles avec leurs hémolysine, leucocidine et agressine, paralysent les défenses du terrain, la phagocytose en particulier, et favorisent ainsi l'infection.

L'étude des vitamines, hormones, auxines, enzymes, oligo-éléments, a montré l'existence de substances de croissance chez les êtres vivants ; pour les virus, ces études sont à leur début.

Les vitamines A, B1, B2, D, ne semblent posséder, par elles-mêmes, aucune action sur le virus aphteux, chez le cobaye, *in vitro* et *in vivo*. La vitamine C augmenterait la virulence *in vivo* [illegible] (HAGENBECK & [illegible], 1957).

Facteur de diffusion

Le facteur de diffusion mis en évidence par DURAN-REYNALS [illegible] est intéressant à considérer pour la culture des virus [illegible]. Le point de départ de ses expériences est l'aggravation considérable des lésions vaccinales produites [illegible] quand le virus est inoculé [illegible] un extrait testiculaire frais. Ces résultats [illegible], puis étendus à d'autres virus [illegible] CHAM & BARRATT, HOFFMAN ([illegible]).

[illegible] & KOBE ont cherché l'action du facteur Duran-Reynals sur le virus aphteux. Ils observent une augmentation de virulence, mais ils pensent que l'extrait testiculaire joue le rôle d'une substance tampon en maintenant le pH à 7,6.

Les études récentes ont prouvé que l'élément actif est

un enzyme dispersif, l'hyaluronidase, connu depuis les travaux de [illegible]EYER, DUBOS & SMYTH (1936) et isolé par CHAIN & DUTHIE (1940). [illegible] les extraits de testicule, de rate, de sang, de sucs, de venins, de tumeurs. [illegible] découvert en 1934 par [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] est antigénique [illegible] la diffusion [illegible] [illegible] A. DELAUNAY, 1947) Les lésions sont ainsi augmentées, mais la virulence du germe ne paraît pas dépendre de sa richesse en hyaluronidase ; c'est une action sur le terrain. Les virus, à eux seuls, n'exercent aucun effet diffusant (DELAUNAY & VOISIN, 1950) leur pouvoir envahissant *in vivo* doit être conditionné par des facteurs d'origine tissulaire. BUSSARD, BEQUIGNON & LAMY (1949) attribuent à la présence d'hyaluronidase dans la bave du chien le danger particulier de la morsure de l'animal enragé.

L'effet dispersif de l'hyaluronidase sur divers ultra-virus a été recherché par LEVADITI, GUEUTIER & VIASMAN (1949). Il est intéressant pour les virus de la vaccine et de l'herpès, mais aucun résultat n'est obtenu avec le virus aphteux. L'hyaluronidase [illegible] point de vue dispersif, chez les cobayes inoculés à une patte postérieure (souche dermotrope) et chez les souris contaminées par voie transcranienne (souche neurotrope)

[illegible]

[illegible]
WAHL (19[illegible]
rus [illegible]
le s[illegible]
(avec des adsorbats atténués de virus aphteux), une substan[illegible]
[illegible]it de 2 à 16 fois le pouvoir infectant du virus aphteux (contenu d'aphte non modifié). Cette substance est décelée du 5ème au 40ème jour (au moins) après la vaccination. Cette augmentation du pouvoir infectant n'est pas provoquée par le virus contenu dans le vaccin car celui-ci n'est pas infectant. D'autre part, le virus n'est jamais décelable dans le caillot ou le sérum sanguin des [illegible] [illegible], éventuellement, s'y trouverait [illegible] dans les mêmes conditions, et ainsi la très faible quantité qui [illegible] dans le sérum ne peut [illegible]

sur la teneur en virus de la lymphe aphteuse considérablement plus riche. Enfin, les doses sub-infectantes de lymphe virulente non traitée ne peuvent pas, non plus, conférer l'immunité.

Cette substance n'est pas infectieuse par elle-même, elle n'est donc pas identique au virus, mais possède les mêmes qualités antigéniques.

KOBE, par l'électrophorèse du virus aphteux, a trouvé, à la cathode, une substance (facteur cathodique) qui peut également augmenter de 2 à 16 fois le pouvoir infectant de la lymphe non modifiée. Son effet est similaire à celui du sérum des cobayes activement immunisés. KOBE présume qu'il s'agit de la même substance. Il se demande si le déclenchement de l'immunité est en rapport direct avec l'apparition de cette substance.

<u>Facteur accessoire de GYE</u>

GYE (1925) a émis l'hypothèse qu'un filtrat infectant de sarcome de Rous du poulet contient, en plus du virus, un facteur secondaire sans lequel le virus est incapable de causer une tumeur. Les cultures, bien que renfermant du virus vivant, ne sont pas infectantes seules, car le facteur secondaire est rendu inerte pendant l'incubation.

Dans cet ordre d'idée, BEDSON & MAITLAND ont pensé que l'im[illegible] Si un facteur secondaire existe, il est nécessairement présent dans les inoculats capables de provoquer l'infection, par exemple dans la lymphe des vésicules des pattes de cobayes, l'épithélium recouvrant ces vésicules etc.

Pour [illegible] l'existence de ce facteur secondaire dans ces matériaux, il est nécessaire de détruire le virus sans léser le facteur secondaire. GYE emploie, dans ce but, le chloroforme pour le virus du sarcome de Rous; mais le virus aphteux est [illegible] résistant et la dose nécessaire pour le tuer détrui[illegible] le facteur secondaire du sarcome de Rous.

Les auteurs anglais ont essayé, sans résultat, de mettre en évidence un facteur secondaire en détruisant le virus aphteux par les procédés suivants

- Incubation dans un tampon phosphaté pH 6,5 à 37° pendant 19 h. ou contact avec 0,5 g. 100 de phénol pendant 48 h. à 26° de la lymphe d'aphtes de cobaye.

  Prélèvement tardif de l'épithélium d'aphtes de cobayes, c'est-à-dire 4 à 5 jours après l'inoculation (dans ce cas la quantité de virus est insuffisante pour infecter).

- Production de liquide de phlyctènes par la chaleur sur le coussinet plantaire, encore sain, de cobayes aphteux, au stade de l'infection primaire.

La présence du facteur secondaire est testée, soit en essayant de réactiver des cultures devenues non infectantes ; soit en titrant du virus actif dans deux séries parallèles : l'une contenant le facteur secondaire, l'autre (témoin) avec une solution physiologique saline.

Dans d'autres essais, également négatifs, les coussinets plantaires de cobayes brûlés par la chaleur sont inoculés avec une "culture" en milieu artificiel qui n'est plus infectante pour des coussinets sains.

Dans cet ordre d'idée, les expériences négatives faites par J. André THOMAS, [illegible] et nous-même, avec les extraits de muqueuse linguale de bovins [illegible] n'ont pas permis de déceler la présence d'un facteur secondaire ou d'un facteur de diffusion du virus aphteux. Il n'est pas exclu que des conditions expérimentales différentes puissent les faire apparaître.

[illegible]

Certains corps chimiques peuvent favoriser la généralisation d'infection à virus.

La [illegible]-éthyl-dibenzo-parathiazine (3277 RP ou Phenergan) présente, à côté de ses qualités antihistaminiques, diverses propriétés : suppression de la réaction locale du phénomène d'Arthus ([illegible], 1949), suppression de la réaction locale inflammatoire chez les lapins ayant reçu une injection sous-cutanée massive de Salmonella typhi murium (HALPERN & REBER, 1949) ; mais, fait paradoxal, chez ces lapins, la généralisation (septicémie et mortalité) de l'infection à Salmonella est favorisée par l'antihistaminique (HALPERN, DUMAS & REBER, 1949).

Le Néo-Antergan (2786 RP) a une action similaire (DUCROT, 1949). [illegible]SARSKI (1949) vient d'observer un fait analogue avec le virus vaccinal. Le traitement à forte dose (40 mmgr./Kg. pendant 5 à 7 jours) des lapins inoculés favorise la dispersion du virus et des germes saprophytes. L'antihistaminique de synthèse paraît provoquer

un abaissement notable de la défense de l'organisme contre la vaccine. Les lésions, la concentration du virus au niveau des organes et la mortalité sont bien plus importantes chez les lapins traités que chez les témoins.

Cette action ne doit pas être considérée comme générale, puisque le 3277 RP n'a pas d'action sur d'autres germes étudiés (Staphylocoque, B. pyocyanique, Streptocoque, Entérocoque) (DUCROT, 1949). Et, au contraire, comme nous l'avons signalé à l'étude du virus aphteux (p. 92), l'évolution de la fièvre aphteuse chez les cobayes est ralentie par l'administration de certains histaminiques.

B) CULTURE *IN OVO*

L'oeuf de Poule en incubation représente une véritable culture de cellules embryonnaires. Suivant ses affinités, l'ultravirus se multiplie dans certaines parties de l'oeuf : membrane chorio-allantoïde, liquide allantoïque, liquide amniotique, vitellus, embryon, ou dans la totalité de l'oeuf embryonné. Une grande quantité de virus peut être ainsi obtenue, elle dépend du nombre d'oeufs utilisés.

ROUS & MURPHY (1911) inaugurent la méthode par les inoculations de filtrats de sarcome de Rous suivies du développement de tumeurs. JOUAN & STAUB (1920) obtiennent une culture du virus de la peste aviaire dans le sac vitellin. En 1931, la technique est codifiée par WOODRUFF & GOODPASTURE (virus de la variole aviaire) et, l'année suivante, par GOODPASTURE, WOODRUFF & BUDDINGH (virus de la vaccine).

Les résultats des essais de culture du virus aphteux *in ovo* sont très contradictoires. La plupart des expérimentateurs ont échoué et les rares travaux positifs n'ont pas été confirmés. Ces différents résultats tiennent, pensons-nous, à la nature des souches de virus aphteux qui paraissent montrer plus ou moins d'aptitude à la culture *in ovo*.

a) Essais de culture d'oeuf à oeuf :

Les premiers essais de culture du virus aphteux *in ovo* sont ceux de la Commission anglaise (1925). Le

[illegible]

[illegible] Pasteur sur la [illegible]

[illegible]

A l'Ile de Riems, BOMS (1936), puis BOMS & TERDEBRUGGE (1938) séparent les virus de la vaccine et de la fièvre aphteuse par culture de lymphe vaccinale et de broyage d'aphtes primaires sur oeufs incubés depuis 12 jours. A 37° le virus [illegible] contrairement à la vaccine. [illegible] (1937) [illegible] l'impossibilité de la culture du virus aphteux sur oeuf incubé.

GALLOWAY (1937) reprend ses travaux en utilisant la méthode de WOODRUFF & GOODPASTURE. Les oeufs sont incubés 9 à 10 jours. Un fragment triangulaire de la coquille est découpé grâce à une fraise de dentiste. Un petit trou est pratiqué au niveau de la chambre à air, ce qui permet la création d'une nouvelle chambre à air artificielle au-dessous du fragment triangulaire et facilite la séparation des membranes coquillère et chorio-allantoïde. 0,05 cc. de virus en bouillon, d'un titre au moins égal à 10^{-5} est déposé sur la chorio-allantoïde, à la [illegible]. Un fragment de coquille ou de cellophane stérile luté à la paraffine referme l'ouverture triangulaire. Une goutte de paraffine obture l'orifice de l'ancienne chambre à air.

Les oeufs (20) sont incubés à 37 ou à 39° C. Aux deux températures le résultat est négatif, les essais de titrage étant faits de 24 heures à 6 jours ; aucune lésion spécifique n'est relevée, le développement de l'oeuf se poursuit normalement. Les cobayes d'essais ne sont ni malades, ni immunisés. Le virus aphteux ne survit pas plus de 24 heures dans l'oeuf de Poule en développement.

GALLOWAY a tenté d'autres essais ; tout d'abord l'inoculation du virus aphteux dans l'oeuf de Poule déjà infecté par le virus de la variole des Canaris. La culture en symbiose des virus aphteux et variolique n'a pas été [illegible] les inoculations soient simultanées ou que le virus aphteux soit injecté 60 h. après [illegible].

GALLOWAY & FAULKNER réussissent mieux leurs essais en oeufs de Cane qu'en oeufs de Poule. In vivo, le virus [illegible] des lésions nettes, alors que les essais chez la Poule sont négatifs. Les oeufs sont incubés 12 à 14 jours. Le virus est filtré en bouillon et inoculé à la dose de 0,05 cc. Avec ou sans greffe de tissus de cobaye, le virus survit souvent (42 fois sur 134 oeufs) ; 2 ou 3 passages d'oeuf à oeuf

[illegible] sont réalisés. Au 4ème passage le titre n'est pas décelable ; à chaque passage positif, il survit de 6 heures à 8 jours, mais les résultats sont encore irréguliers et les oeufs inoculés sont loin d'être tous infectés. Les embryons ne paraissent pas affectés par l'inoculation, ils ne sont pas virulents. La chorio-allantoïde réagit par un oedème et, quelquefois, une prolifération épithéliale. Ces lésions ne semblent pas spécifiques puisque l'injection de filtrat de coussinet plantaire non infecté produit des lésions similaires, quoique moins intenses. Les résultats sont meilleurs avec la souche O Vallée qu'avec la souche Rhodésie.

PERAGALLO, à Pavie en 1937, affirme la culture du virus aphteux de type A sur la chorio-allantoïde de l'embryon de poulet. Il inocule, dans la chorio-allantoïde d'oeufs de 12 jours d'incubation, de la lymphe prélevée directement dans une vésicule aphteuse. En 36 à 48 heures, à 37-38°, apparaissent, sur la membrane, des petites vésicules dont il publie les photographies. Les vésicules irradient autour du point d'inoculation. Elles sont différentes de celles produites par le virus vaccinal, celles-ci sont plus rares et plus volumineuses. Au 4ème jour d'incubation, il recueille la chorio-allantoïde, la broie au mortier, la titre sur cobayes et effectue ses passages. L'activité du virus est maintenue au cours de 20 passages.

Ces résultats n'ont été confirmés ni par les travaux de WEINECK en 1938, ni par ceux de RICHTER en 1939.

WEINECK (technique de BURNET) constate une meilleure survie du virus sur les embryons de 4 à 6 jours. Il emploie de la lymphe virulente ou du virus de culture suspendu au 1/100 dans une solution de Tyrode et filtré sur bougie Berkefeld V. Les oeufs infectés sont incubés à 37° pendant 24 à 96 heures. Il ne constate ni réaction histologique sur les tissus embryonnaires, ni preuve de culture du virus. Des fragments plantaires transplantés sur l'oeuf conservent leur virulence pendant 36 heures.

RICHTER, à l'Institut de Riems, a recommencé les expériences de PERAGALLO, dans le but de les confirmer. D'après ses propres expériences, le virus aphteux ne cultive pas sur la chorio-allantoïde des embryons de Poule. Le virus est détruit, au plus tôt au premier passage après 16 heures d'incubation à 37° et, au plus tard, au 2ème passage, après 48 heures d'étuve à 37°. Les résultats sont les mêmes qu'il s'agisse de virus de Bovin ou de Cobaye. Les virus témoins ont un titre de 10^{-2} à 10^{-6}. Le pH varie de 7,2 à 7,8 dans 12 séries d'essais (de 1 à 11 oeufs chacune). Les embryons sont âgés de 11 à 14 jours. Des lésions [illegible] de la membrane ne sont pas provoquées par le virus, elles [illegible]
[illegible]

albumines hétérologues. L'examen histologique montre une hyperplasie épithéliale et une infiltration cellulaire de la couche moyenne du tissu conjonctif. L'auteur a observé les mêmes altérations sur des membranes inoculées de virus ou d'une solution non virulente.

En 1941, sous la direction de WALDMANN, de nouveaux essais de passage sur oeufs de virus de types différents sont entrepris, sans succès, à l'Ile de Riems.

Pensant que la souche neurotrope de virus aphteux adaptée par NAGEL & HOFFMANN à la souris avait acquis de nouvelles propriétés, LEVADITI, PERAULT & SERGENT essayent, en 1944, de la cultiver sur la chorio-allantoïde d'oeuf incubé de poule. Les embryons âgés de 7 à 12 jours sont, après infection, remis à incuber 5 à 11 jours, selon les séries (8 séries et [illegible] passages). Les examens sont faits après 4, 7 ou 11 jours. Des lésions macroscopiques et microscopiques sont observées 16 fois sur 40 membranes. Elles siègent sur l'épithélium ectodermique et les tissus mésodermiques. Elles consistent en altérations épithéliales prolifératives réunies en foyers. Les cellules sont hypertrophiées [illegible]. La confluence des vacuoles, dans une phase ultérieure est semblable à celle des vésicules [illegible] sur le coussinet plantaire des cobayes inoculés [illegible]. L'évolution des lésions [illegible] dans l'oeuf et chez le cobaye, [illegible] envahissent les vésicules, et les tissus mésodermiques offrent des réactions inflammatoires plus ou moins intenses.

[illegible] La virulence ne peut être retrouvée à partir des membranes lésées, ni par inoculation dans le cerveau de la souris, ni dans la patte du cobaye (1 seul cas d'encéphalite mortelle en 4 jours chez une souris). La souche [illegible] est donc incapable de cultiver en [illegible] pour déterminer l'[illegible] [illegible] les auteurs [illegible] l'hypothèse [illegible] en la cultivant *in situ* sur des [illegible]

[illegible] (1946), à l'Institut Pasteur, n'a pas réussi à cultiver le virus aphteux par inoculation dans le liquide amniotique ou dans le vitellus d'embryons de [illegible] passage est virulent pour le cobaye, mais [illegible] ultérieurs ne produisent ni infection, ni [illegible]

HENDERSON, 1949 (communication orale) inocule, sans succès, le virus aphteux à des embryons de poule, par voie intraveineuse.

MICHELSEN (1951) constate la disparition du virus aphteux dans tous les cas où il a essayé de le cultiver de façon continue sur oeufs, sans adjonction de tissu de mammifères.

En résumé, le bilan des essais de culture d'oeuf à oeuf est défavorable. On peut citer comme positives, mais non confirmées, les expériences de PERAGALLO sur oeuf de Poule et, dans une certaine mesure, celles de GALLOWAY sur oeuf de Cane.

b) Passages alternés oeuf-animal :

En 1948, TRAUB & SCHNEIDER affirment la possibilité de la culture sur oeuf de Poule. Ils basent leur méthode sur le choix d'une souche favorable et surtout sur l'alternance des passages de l'oeuf au cobaye. Ils auraient découvert ce procédé indépendamment des travaux de BAKER (1946) pour le passage du virus de la peste porcine au lapin et de SHOPE, GRIFFITHS & JENKINS (1946) pour celui de la peste bovine sur oeufs.

L'infection du premier oeuf est réalisée par un mélange de 10 souches de virus aphteux (4 de type O, 5 de type A et 1 de type C). Les auteurs voulaient, à juste titre, s'assurer de la possibilité du principe de culture et il était naturel de penser que toutes les souches n'avaient pas la même affinité pour les oeufs de Poule. L'identification du type de la souche ayant cultivé est possible par la méthode de déviation du complément.

Les oeufs incubent 10 jours (mise en culture) et 9 jours (passages) à 37°6 avant d'être inoculés. Après l'inoculation virulente, selon les séries, les oeufs sont maintenus à 37°6 pendant 40 à 48 h (série C) ou 72 h (série E). L'inoculation des oeufs de la mise en culture s'effectue au moyen de filtrats stériles (bougie Berkefeld N) de broyats d'aphtes de cobayes à 5 p. 100 (mélange des 10 souches de virus).

Le mode d'infection se simplifie au fur et à mesure des passages. Au début, le virus est injecté en plusieurs points de la membrane affaissée puis, après cette injection, quelques gouttes de virus sont déposées sur la membrane et injectées dans le vitellus. Au bout de quelques passages, cette dernière injection est arrêtée, puis, à partir du 10ème, il est simplement déposé 0,2 cc de virus sur la chorio-allantoïde. Le matériel de passage consiste en extraits de membrane dans un mélange de liquide allantoïdien et de tampon phosphaté à M/15. A partir du 62ème passage, les extraits embryonnaires sont seuls employés puisque l'affinité du virus diminue pour la membrane et augmente pour l'embryon.

Pour TRAUB & SCHNEIDER leur résultat tient à l'alternance des passages sur oeufs et sur cobayes.

Une série témoin (B) de passage continu d'oeuf à oeuf a dû être interrompue au 3ème passage, ce qui confirme les résultats antérieurs. Dans la série alternée oeuf-cobaye (A), au 5ème passage sur oeufs (5 oeufs et 2 cobayes) une série dérivée (C) d'oeuf à oeuf a pu être poursuivie, elle a atteint au moins 125 passages. Au 10ème passage de cette dernière série, l'extrait virulent d'embryon à 10 p. 10 est substitué à l'extrait de membrane (série E) ; ce matériel d'inoculation n'a amené aucune modification, ni adaptation particulière à l'embryon. Cette série E est abandonnée au 50ème passage. Des essais d'injection de virus de culture sur oeuf dans le vitellus n'ont pas donné de résultat.

La souche de culture appartient au type O. Des contrôles sur cobayes guéris ont confirmé le résultat donné par la déviation du complément. Au cours des essais cette souche O passée sur oeufs se modifie :

- son pouvoir pathogène à l'égard des cobayes diminue, la mortalité passe de 70 à 6 p. 100 ; la généralisation et la taille des aphtes se maintiennent mais auraient tendance à décroître.
- le virus perd, du 17ème au 21ème passage, son pouvoir immunisant pour le cobaye ; la déviation du complément prouve des modifications dans sa structure antigénique (mais toujours dans le cadre du type sérologique O) ; des essais ultérieurs n'ont pas confirmé cette variation, contrairement à celle du pouvoir pathogène.
- le pouvoir pathogène (virus de 9ème passage E) serait conservé et peut même être exacerbé pour les bovins (1 sur
- le pouvoir pathogène du virus pour les embryons de poule s'accroît au cours des passages ; la mortalité des embryons atteint 97 p. 100 au 100ème passage.

Le virus se multiplie fortement pendant les 22 premiers passages (série C) sur la membrane. Le titre atteint 10-4 et 10-5. Le liquide allantoïdien est infectieux, contrairement au vitellus. L'embryon n'est virulent qu'après 48 h. Au cours des passages suivants (du 46ème au 88ème), après la mort des embryons, la membrane et le liquide allantoïdien ne sont presque plus porteurs de virus, le vitellus n'en a toujours pas, alors que l'embryon et le liquide amniotique sont constamment infectants. Les embryons, après la mort,

sont légèrement cyanosés, leurs muscles oedématiés ; ils présentent de l'ascite et de nombreuses pétéchies superficielles ; plus ils résistent, plus leurs lésions sont importantes.

TRAUB n'observe, contrairement à PERAGALLO, aucune lésion sur la chorio-allantoïde. Il détermine, par la méthode de déviation du complément, la localisation du virus dans les oeufs. L'antigène est l'extrait à 20 p. 100 des parties de l'oeuf devant être examinées. Les extraits d'oeufs témoins, non infectés, donnent des résultats négatifs. Les oedèmes et le liquide d'ascite, la musculature du corps, le coeur, sont riches en antigène. La musculature du cou en contient moins, le cerveau, les yeux, le bec, l'extrémité des pattes, le foie, les reins, l'appareil digestif en sont exempts. La chorio-allantoïde, le vitellus, les liquides amniotique et allantoïdien renferment, au plus, des traces d'antigène déviant le complément. TRAUB a sélectionné, pour les repiquages ultérieurs au 83ème passage, les parties de l'embryon contenant de l'antigène.

Les essais de titrage de virus, dans les suspensions à 20 p. 100 de parties embryonnaires, sont faits sur oeuf ou sur Cobaye. L'infection est réalisée par 0,2 cc. de virus dans une solution phosphatée M/15 à pH 7,6, à 0°. Les titres sont faibles et plus élevés pour l'inoculation de l'oeuf (10^{-4} à 10^{-5}) que pour celle du cobaye (10^{-3}).

Le virus de passage sur oeuf (88ème) a permis à TRAUB de préparer un vaccin par adsorption sur hydroxyde d'alumine à pH 7,6, addition de 0,05 p. 100 de formol et chauffage à 25° C. pendant 24 heures. Malgré l'injection de doses variées à 18 cobayes le résultat est négatif. TRAUB pense que le faible titre n'y est pour rien ; il rapproche ses essais de ceux de SHOPE et de ses collaborateurs sur le virus de la peste bovine, qui n'ont pu immuniser, dans ces conditions, le bovin à l'aide du virus cultivé sur l'oeuf. Les vaccins sont efficaces s'ils sont préparés avec du matériel venant de l'espèce animale à laquelle ils sont destinés. Pour expliquer les échecs de la vaccination, TRAUB incrimine la faible teneur en virus, la surcharge du mécanisme d'immunité avec une forte dose d'antigène non spécifique (protéines de l'oeuf ou de l'embryon).

PETERMANN (1949) renouvelle, en Argentine, les expériences de TRAUB. Il cultive, avec succès, une seule souche par 6 passages alternés cobaye-oeuf, puis, ensuite, 25 passages d'oeuf à oeuf. Il pense que l'accroissement du virus dans l'oeuf est mal connu par titrage sur bovins ou cobayes et que si, au cours des premiers passages, le type du virus reste stable, il peut varier par la suite. Il conclut que le virus cultivé sur oeuf ne répond pas encore aux exigences d'utilisation pratique.

MICHELSEN (1951) a essayé, sans succès, la culture du virus aphteux par passages alternés boeuf et oeuf, cobaye et oeuf, culture de tissu et oeuf. Ce résultat est en accord avec nos propres expériences exposées plus loin et prouve que les succès de TRAUB et ses collaborateurs ne peuvent, jusqu'ici, être considérés comme généraux.

c) <u>Passages sur tissus greffés dans l'oeuf embryonné</u> :

TENBROEK (1941) cultive le virus de la peste porcine sur fragment de testicule de porcelet déposé sur la chorio-allantoïde. GOODPASTURE & ANDERSON (1942) reprennent le procédé pour le virus de l'herpès et de la vaccine sur greffes de placenta humain sur la chorio-allantoïde. L'intérêt de cette technique réside dans le fait que les virus qui ne se multiplient pas sur la chorio-allantoïde, cultivent sur les greffes.

Bien avant, TENBROEK, [illegible] & GALLOWAY (1937) avaient imaginé la technique par des essais de culture du virus aphteux dans des tissus embryonnaires de cobayes greffés sur la chorio-allantoïde d'oeuf de poule en incubation. La greffe est prise en 24 heures. Les coussinets plantaires, ou des tissus de la langue, ou un broyage de tout l'embryon de cobaye sont employés. Le virus est mélangé au tissu au moment de la greffe, ou 24, 48, 72 heures après. Les oeufs sont ouverts 24, 48, 72 heures après l'introduction du virus ; celui-ci survit irrégulièrement ; dans un cas un passage d'oeuf à oeuf a été réalisé, mais la multiplication du virus n'est pas démontrée.

MICHELSEN, SCHMIDT-THOMSEN, MALMQUIST (1950-1951) tentent d'adapter diverses souches de virus aphteux sur l'oeuf de poule incubé par divers procédés, dont deux sont retenus :

- culture du virus sur épithélium de langue de bovin transplanté sur la chorio-allantoïde.

Des fragments d'épithélium bovin sont placés sur la chorio-allantoïde d'embryon de poule. Le virus aphteux O se maintient au cours de 14 passages en série et 2 passages alternés ; un virus A cultive pendant 19 passages en série. Le tissu épithélial adhère fortement à la chorio-allantoïde après 44 heures d'incubation et il prolifère intensément en 96 heures. Le virus est retrouvé dans la membrane et sa greffe, le liquide allan-

[illegible] et parfois l'embryon. Les passages alternés oeuf avec tissu et oeuf sans tissu sont possibles, mais non les passages continus sans tissu.

- Culture simultanée de virus et d'épithélium de langue bovine sur la chorio-allantoïde d'oeufs désembryonnés.

Il s'agit de la technique de BERNKOPF pour la culture du virus de l'influenza. Les oeufs, incubés depuis 14 jours, sont vidés à l'exception de la chorio-allantoïde qui sert de support à la culture, celle-ci se compose de : la moitié de l'épithélium d'une langue émincé et suspendu dans 15 cc. de liquide de Tyrode et 25 cc. d'une suspension de virus ; l'ensemble est trituré, clarifié par centrifugation et mélangé à 100 cc. de liquide de Baker contenant de la pénicilline et de la streptomycine (quantité pour 6 à 7 oeufs). Les coquilles contenant la membrane, la suspension de virus et le tissu sont placées sur un plateau tournant 10 fois par minute ; l'incubation est de 24 à 36 heures. C'est une variante de la technique des tubes tournants de GEY. Le milieu est constamment agité et en contact répété avec une large surface de la membrane. Les facteurs inhibiteurs de l'oeuf (embryon etc...) sont éliminés, l'adaptation du virus à l'oeuf doit être facilitée.

Avec cette méthode, les auteurs danois entretiennent, pendant 31 passages, une souche de virus O. Le virus aphteux ne cultive qu'en présence de tissu.

d) <u>Recherches personnelles</u> :

En collaboration avec J. Paul THIERY et Léone SALMON, nous avons tenté de cultiver le virus aphteux selon les méthodes de TRAUB et de FAULKNER-GALLOWAY.

Les oeufs de Poule de races : Wyandotte, Gâtinaise ou Leghorn, sont mis à incuber 9 à 12 jours. Ils sont inoculés, selon la méthode classique de WOODRUFF - GOODPASTURE, par la formation d'une chambre à air artificielle. La coquille est perforée à l'aide d'une meuleuse électrique Rotofield.

Le matériel d'inoculation est représenté par la lymphe aphteuse, les parois d'aphtes, ou le sérum de cobayes en période de généralisation. Les aphtes sont broyés au mortier en présence de silice, dilués en liquide physiologique tamponné à pH 7.6, centrifugés, puis filtrés sur disque Seitz EK 1. La lymphe et le sérum des cobayes malades sont prélevés aseptiquement et inoculés sans préparation. Les chorio-allantoïdes, au cours des passages, sont broyées au mortier, diluées et centrifugées.

Nous avons fait 15 séries d'expériences représentant l'utilisation de 64 oeufs et 31 cobayes. Nos virus, de différentes souches, sont des trois types : O, A, C, d'origine bovine ou cobaye, virus

[illegible]
chorio-allantoïde, dans la cavité amniot[illegible]
[illegible]
couveuse à 37°5 ou dans une étuve à 37°. [illegible]
ture est de 48 à 72 heures.

[illegible]
symptômes caractéristiques chez les cobayes, cepe[illegible]
chez deux animaux il y a eu apparition d'un petit [illegible]
[illegible]
oeufs de ces aphtes furent sans résultat.

Nous avons essayé d'adapter le virus aphteux à l[illegible]
par des temps de culture de durée croissante et [illegible]
[illegible]
de celui-ci sert à inoculer un 2ème oeuf laissé 18 [illegible]
37°, son titrage sur cobayes est positif. Le 3ème [illegible]
ge sur oeuf est de 28 h. ; c'est le dernier [illegible]
[illegible] sur oeuf. La même suspension virulente laiss[illegible]
étuve le même temps (28 h.) perd sa virulence. L[illegible]
tation du temps d'incubation entraîne la disparition [illegible]
l'activité de ce virus. Nous n'avons observé qu'une s[illegible]
ple survie sans multiplication, ni adaptation sur la
chorio-allantoïde.

[illegible]
de greffes de peau et de poumon embryonnaires sur [illegible]
rio-allantoïde n'ont pas été plus favorables. Le [illegible]
reste actif tant qu'il y a des tissus de cobayes gre[illegible],
mais la virulence disparaît si les tissus sont suppr[illegible].
D'autres essais de culture du virus aphteux sur oeu[illegible]
en symbiose avec les virus de la vaccine, de la diphté[illegible]
aviaire ou du sarcome de Peyton-Rous ont échoué.

En résumé, dans nos conditions expérimentales, nous
[illegible]
l'oeuf incubé. Nous avons simplement maintenu le virus
pendant 3 passages alternés (3 sur oeufs et 3 sur c[illegible]

et constaté une survie du virus aphteux sur la chorio-allantoïde qui n'excède pas [illegible] heures.

Nous pensons que ce résultat, en contradiction avec les expériences de TRAUB, mais en confirmation de celles de EICHHORN, tient à la nature de nos souches de virus.

Conclusions

La culture du virus aphteux _in ovo_ est discutée, malgré les résultats de [illegible], TRAUB & PETERMANN.

Les vaccins préparés avec les virus obtenus par ces auteurs n'ont pas montré de qualités immunisantes pour les mammifères. On peut conclure que le virus aphteux ne semble avoir aucune affinité particulière pour les tissus aviaires.

C) CULTURE IN VITRO :

"Voir les virus filtrants
"serait certes un grand
"progrès, mais en obtenir
"des cultures dans les mi-
"lieux artificiels serait
"un résultat d'une impor-
"tance incalculable."

H. CARRE (1909)

1) Culture en symbiose avec des levures ou des bactéries

Il s'agit d'une culture *in vivo* du virus aphteux sur des organismes vivants et d'une culture *in vitro* de la levure ou de la bactérie sur un milieu artificiel. Les microorganismes visibles, vivant et se multipliant, servent de milieu nutritif et de substrat pour la culture du virus. C'est la méthode de culture du bactériophage.

En [illegible], VOLPINO obtient des cultures de la vaccine pendant [illegible] passages successifs sur un milieu gélatine - glycérine - sang contaminé accidentellement par des [illegible] : *Bacillus subtilis*, *Bacillus proteus* et différents *cocci*. [illegible] ([illegible]) essaye la culture du virus de la rougeole en symbiose avec différents germes : pneumocoque, streptocoque.

[illegible] & BURBURY ([illegible]27) ont cherché les effets de la symbiose avec différentes bactéries sur la culture du virus aphteux à 37° C. Le milieu utilisé est : 1 partie de sérum de cobaye, 4 à 5 parties de Phosphate M/25 à pH 7,6 et 4 à 5 parties de bouillon digéré. Le virus est [illegible] de tubes ensemencés de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus albus*. L'incubation est [illegible] et chaque jour le virus est testé sur cobayes. Avec *Staphylococcus albus*, le virus survit moins longtemps que dans les tubes témoins. *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* n'ont pas d'effet sur la survie.

[illegible] ensemencement d' [illegible] *Torula kefir* avec [illegible] tenir la culture [illegible]

ce dernier pendant 75 repiquages de tube en tube. Le virus conserve ses propriétés pathogènes spécifiques pour le lapin et le cobaye.

La technique consiste à ensemencer la suspension de virus filtrée (active au 1/100) dans 10 cc. de bouillon à pH 7,2 contenant déjà la culture de levures depuis quelques heures. Au bout de 3 jours à 37°, 0,5 cc. de bouillon est repiqué sur un autre tube de bouillon.

Cette culture n'a pas été confirmée par AMIES (1934).

FRENKEL a tenté, sans succès, d'appliquer cette méthode à la culture du virus aphteux sur Torula kefir ou Saccharomyces fragilis. 10 cc. de bouillon ou Tyrode, à pH 5,8, sont ensemencés avec Torula kefir et mis à 22° pendant 24 heures. 1/2 cc. de virus aphteux de type A filtré sur Chamberland, en solution physiologique, actif à 5.10^{-4} sur cobaye, est ajouté à la culture de levures qui est placée à 37°.

Dans la plupart des expériences, la présence du virus ne peut être démontrée après 24 heures ; elle ne l'est jamais après un séjour de 4 jours à 37° ou après un 2ème passage. Pour les quelques cas positifs en les passages, FRENKEL pense qu'il n'y a qu'une simple survie du virus. Des expériences complémentaires, avec broyage des cultures, solution de Tyrode à différents pH, 7, 7,6, n'ont pas eu d'influence sur le résultat.

Des expériences positives sont réalisées, en 1936, par [illegible] & BUSCH : 4 passages du virus aphteux sur Staphylococcus albus et 60 passages sur Torula rubra. Les témoins en bouillon sans levures sont négatifs. Les titrages du virus sont faits sur cobayes. Différentes espèces de levures (de vin en particulier) se prêtent aux repiquages de virus pendant 3 à 7 générations ; d'autres levures et Staphylococcus aureus, Staphylococcus citreus, Sarcina [illegible], Bacillus proteus vulgaris, Bacillus mesentericus, sont réfractaires.

Le virus employé, indifféremment, en lymphe aphteuse ou en suspension d'aphtes broyés au 1/100 en solution de Tyrode à pH 7,6, filtrée sur Berkefeld N. Il est actif sur cobaye au titre de 1.10^{-6}. Il suffit d'ajouter 0,5 cc. de filtrat à 4,5 cc. de bouillon nutritif à pH 7 ensemencé de levures 1 heure auparavant. On repique, ensuite, tous les 3 jours, 0,5 cc. de culture dans 4,5 cc. de bouillon neuf. Les tubes sont conservés, à l'obscurité, à 37°.

Différentes expériences, en faisant varier le milieu de suspension du virus (solution physiologique de [illegible], liquide de Tyrode), la dilution du virus (1/50, 1/1000, 1/500), la filtration (Berkefeld N ou V), le titre (5.10^{-7} à 1.10^{-6}), la quantité de

prélèvement pour le repiquage (mise en culture : 5 cc. de filtrat et 5 cc. de bouillon et, pour les passages : 1 cc. de culture et 9 cc. de bouillon neuf, ou, mise en culture : 1 cc. de filtrat et 9 cc. de bouillon puis, 0,2 cc. de culture et 9,8 cc. de bouillon), la densité microbienne (ensemencement du virus 1 ou 3 h. après celui de la levure ou du microbe), la température (celle de la [illegible]), le pH (7,6 à 6,5), prouvent l'influence [illegible] sur la multiplication du virus aphteux. Par exemple, des pH de 6,7, 6,8 et 6,9 qui permettent la culture des levures, donnent un résultat toujours négatif pour le virus.

Les croissances des levures et du virus semblent parallèles. La culture du virus n'est pas positive dans tous les essais ; les résultats sont irréguliers. Dans une expérience, sur *Torula rubra*, les auteurs admettent [illegible] le virus est actif, alors que le virus primitif de départ [illegible] dilué à 10^{-22} [illegible] la même levure leur a donné, dans d'autres expériences, des résultats négatifs. Ils ont obtenu, avec la levure L, 20 passages positifs alors que, dans un autre essai, dès le 3ème passage, à la dilution de 10^{-4}, ils ne pouvaient plus déceler le virus.

Ces expériences prouvent qu'il y a possibilité de multiplication [illegible], mais les [illegible] sont très inconstantes pouvant varier avec la même espèce de levures. Elles mériteraient d'être reprises.

Il y aurait intérêt, pensons-nous, à tenter des [illegible] la fièvre [illegible] bacille de [illegible] sur levures et [illegible], ainsi que le choix des souches de virus.

[illegible]

[illegible] virus aphteux atténué, susceptible [illegible] vaccin, paraît subordonnée [illegible] de culture en milieu "artificiel" exposée par LECLAINCHE & VALLEE, en 1909, au IXème Congrès International de Médecine Vétérinaire de La Haye.

[illegible] Congrès International de la [illegible]

"La question est difficile puisque LOEFFLER, l'un des plus grands "savants de l'Allemagne, a vainement cherché sa solution pendant "plus de vingt ans d'un labeur acharné ; cependant il se peut qu' "une méthode nouvelle donne la clé du problème." Et LOEFFLER lui-même : "Nous nous sommes efforcés de faire des cultures de cet "agent" - le virus aphteux - "mais nous n'avons réussi qu'en mi- "lieu animal ; toutes nos autres tentatives sur les milieux uti- "lisés ont échoué."

La culture du virus chez l'animal vivant est classique, mais il est difficile d'obtenir les multiplications du virus en dehors de l'organisme. C'est une des caractéristiques du groupe des ultra-virus à laquelle le virus aphteux ne faillit pas.

Essais divers

Les méthodes de culture utilisées en bactériologie échouent pour les virus. Bien entendu la culture de l'ultra-virus aphteux sera seule envisagée dans ce chapitre et nous ne citerons pas les nombreux travaux antérieurs à la découverte de ce virus ayant trait à la culture de germes, parasites, [illegible], pris, à tort, pour l'agent spécifique de la fièvre aphteuse et qui sont considérés actuellement comme des germes de sortie.

Nous ne pouvons davantage considérer les essais infructueux de la culture du virus dans les innombrables milieux nutritifs artificiels à base de composés azotés, hydrocarbonés, minéraux, et en atmosphères diverses : oxygène, gaz carbonique etc...

Les essais de culture du virus aphteux effectués par [illegible], [illegible] (1911-1914) ont échoué ; 2 cc. de lymphe aphteuse, au 1/10, filtrée sur bougie, sont ensemencés dans différents milieux : sérum de boeuf chauffé, sérum coagulé additionné ou non de morceaux d'organes de veau ou d'embryons de cobaye, bouillon, gélose, milieu de Novy-McNeal-Nicolle, gélose glucosée, en conditions d'aérobiose ou d'anaérobiose. Après 1 à 7 jours à 37°, les repiquages et les inoculations à des génisses sont négatifs ; cependant dans le milieu Novy-McNeal-Nicolle l'eau de condensation est encore virulente après 22 jours à 22°.

PFEIFFER & GRUGEL (1913) étudient la culture dans du bouillon préparé à partir de langue, [illegible], pancréas, glandes salivaires de veau. Sur la base de la présence de gaz carbonique, ils en déduisaient la preuve de la vie du virus, mais la lymphe d'ensemencement n'était pas exempte de germes, leurs milieux étaient souillés.

[illegible] (1922) affirme avoir cultivé, pendant 4 générations, le virus aphteux à partir de lymphe aphteuse bactériologiquement stérile. Le milieu est le bouillon Martin additionné de 15 à 20 p. 100 de sérum de boeuf. [illegible] l'ensemencement

la lymphe [illegible] est encore plus favorable que le bouillon et le sérum provenant du cobaye.

Les recherches de REINHARDT & [illegible] (1922) avec les mêmes milieux, plus fortement alcalins, ne conduisent pas à de meilleurs résultats.

DE BLIECK & [illegible] (1923) utilisent du sérum virulent ou du sang avec ou sans extraits filtrés de muqueuses bovines, additionnés de moût de raisin, de lait ou de glycérine et maintiennent le tout à différentes températures : aucun résultat.

En 1924, toute une série de travaux séparés de TITZE, GUTH, PFEILER, dominés par ceux de DAHMEN & FROSCH, conduisent à la culture par les milieux [illegible]. TITZE [illegible] généralement incapables de produire la maladie [illegible] par leur [illegible] immunité. GUTH décrit une méthode de culture possible, puisqu'il dit avoir produit une infection avec les cultures des 7ème et 9ème passages. PFEILER améliore ses bouillons à base de tissus de prédilection du virus ; la muscine en rend la filtration difficile.

Les travaux les plus formels sont ceux de DAHMEN (culture) et FROSCH (morphologie). Ces auteurs annoncent la culture, par des méthodes spéciales, sur milieux solides, de corps bacillaires très petits : Loefflerella [illegible], lesquels, [illegible], sont les agents responsables de la fièvre aphteuse. Les colonies, ainsi que les corps eux-mêmes, sont visibles seulement au moyen de photographies en lumière ultraviolette.

Le milieu de DAHMEN consiste en 3 p. 100 de gélose en bouillon de veau [illegible] additionné de 20 à 50 p. 100 de sérum de cheval ou de boeuf ; le pH est de 7,8. Les tubes, inclinés, sont ensemencés avec le dépôt obtenu par centrifugation de lymphe diluée et filtrée. Ils sont incubés à 34° en conditions aérobies. Au bout de 9 à 10 jours apparaissent des micro-colonies devenant de plus en plus importantes jusqu'à former, finalement, un "film" à la limite de la visibilité à l'oeil nu. Les repiquages se font par mélange, au fil de platine, des "colonies" avec l'eau de condensation.

Les auteurs prétendent avoir reproduit la maladie, chez le cobaye, avec la culture du [illegible]ème passage ; la virulence est atténuée puisqu'il a fallu 3 passages

sur le cobaye pour obtenir les lésions classiques, celles-ci ont été produites directement par une culture du 7ème repiquage. FROSCH & DAHMEN considèrent la centrifugation de la lymphe comme un élément essentiel de leur succès, elle doit concentrer le virus et le séparer d'anticorps hypothétiques dont ils considèrent la présence comme possible.

Ces expériences ne sont confirmées que par RUPPERT (1924, cité par DAHMEN, 1925). Dès 1924, celles de TITZE, GUTH, PFEILER et surtout de DAHMEN & FROSCH sont recommencées en Angleterre, au Laboratoire du Ministère de l'Agriculture de New-Haw, par STOCKMAN & MINETT, et au Lister Institute à Londres par BEDSON & MAITLAND.

A New-Haw, deux essais "paraissent positifs", mais ils ne sont pas retenus car leur interprétation est délicate. 1er essai : le contenu de tubes incubés à 37° pendant 36 jours produit, par inoculation, une fièvre aphteuse chez le cobaye ; 2ème essai : de la lymphe de cobaye diluée en solution physiologique, centrifugée, est ensemencée sur gélose, selon la technique de DAHMEN & FROSCH ; après 10 jours à 33-34° les inoculations sont négatives, cependant après 17 jours d'incubation l'inoculation à un cobaye provoque un aphte primaire dont 4 repiquages successifs n'arrivent pas à donner une fièvre aphteuse généralisée. Les cobayes ne sont pas immunisés comme le montrent des inoculations virulentes ultérieures.

Le comité anglais a jugé que ces résultats sont dûs à la survie de petites quantités de virus plutôt qu'à sa multiplication. Les auteurs anglais de New-Haw sont cependant entrés dans les plus petites variations de technique : abaissement de la tension d'oxygène, grandeur des tubes capuchonnés ou non, température 34 à 37°. La survie sur milieu de DAHMEN est de 27 jours et, sur gélose inclinée, de 33 jours.

Au Lister Institute, BEDSON & MAITLAND n'ont que des résultats négatifs. Ils obtiennent une apparence de colonies semblables à celles de FROSCH & DAHMEN, mais ils produisent le même effet par la lymphe diluée, chauffée à 56° pendant 1 heure. DAHMEN reconnaît ces faits mais prétend pouvoir distinguer les véritables colonies. Pour les auteurs anglais, ce sont des "artéfactes", opinion confirmée par le fait qu'ils ne peuvent reproduire la fièvre aphteuse, chez le cobaye, par inoculation de ces soi-disant cultures. Pour eux la centrifugation ordinaire ne permet pas une concentration appréciable du virus. Si les auteurs allemands ont réellement obtenu une culture, leur succès dépend, non seulement des détails de leur technique, mais aussi de conditions fortuites inconnues.

Pour conclure, énumérons les diverses Commissions et les auteurs qui ont infirmé les travaux de DAHLEN & FROSCH : Commission Allemande dirigée par GINS (1924-1925 - dans le bouillon Martin additionné de gélose et de sérum, le virus est tué en trois jours -), Commission Anglaise (1er rapport 1925, 2ème rapport 1927 - auteurs déjà cités), Commission Américaine dirigée par OLITSKY, TRAUM & SCHOENING (1926 - le bouillon Martin, le sérum, sont des milieux défavorables au virus, les milieux tamponnés aux phosphates sont bien meilleurs), Travaux non publiés de NOCARD, ROUX, VALLÉE, CARRÉ, de 1903-1928, relatés dans leurs cahiers d'expériences (Archives du Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires).

Notons encore quelques essais infructueux de BEDSON & MAITLAND (1925-1927) sur des milieux différents du bouillon Martin : bouillon de caséine digérée, riche en acides aminés, additionné ou non de diverses substances : sérum (cheval, mouton, lapin), liquide d'ascite (20 p. 100), sang de cobaye défibriné (5 p. 100), extrait de foie (10 p. 100), glucose (1 p. 100), cystine (1 p. 100), gélose (2 p. 100). D'autres essais sont faits avec du bouillon additionné de sérum et d'extrait d'embryon de cobaye, avec ou sans fragments d'embryon de cobaye, du milieu de Novy-MacNeal-Nicolle avec sérum de lapin et solution de Locke (1 p. 5) ou liquide d'ascite et solution de Locke dans les mêmes proportions ; milieu de Dorset à l'oeuf ; sérum concentré de Loeffler ; sang de cobaye virulent et bouillon digéré avec ou sans trypsine. A Strasbourg, OLITSKY & BOEZ (1927) tentent la culture en milieu de Smith-Noguchi, à 32-34°, en aérobiose, en anaérobiose, en atmosphère à 10 p. 100 de gaz carbonique. Le matériel d'ensemencement est du sang virulent de cobaye, de la lymphe filtrée ou non, des broyages d'aphtes de coussinets plantaires de cobayes filtrés ou non, des broyages d'aphtes de langue ou onglon de bovin. Tous les essais sont négatifs.

Une méthode originale de culture sans cellules a été préconisée par EAGLES & McCLEAN (1930) pour le virus de la vaccine. Il s'agit de milieu à base de liquides animaux libres de cellules : liquide surnageant, après centrifugation, du broyage fin du mélange de rein de lapin et de solution de Tyrode ; le liquide clair obtenu contient des traces de débris cellulaires et permet, d'après les auteurs, une culture équivalente à celle donnée par

les méthodes de CARREL - RIVERS ou de MAITLAND, mais ce milieu présente l'intérêt d'être exempt de cellules vivantes. Ces expériences n'ont pas été confirmées, en particulier par RIVERS & HAAGEN.

FRENKEL (1937) n'a obtenu aucun résultat par ce procédé appliqué à la culture du virus aphteux, celui-ci perd rapidement son activité, à 37°, dans un tel liquide.

Actuellement on peut affirmer que pas plus que pour aucun virus filtrant vrai, pas une culture du virus aphteux n'a été réussie sans cellules, au contraire, le plus souvent, le virus y devient inactif en peu de temps. Ces essais, cependant, n'ont pas été vains, ils ont incité des chercheurs, en particulier les membres de la Commission Anglaise de Recherches sur la fièvre aphteuse, à entreprendre les études sur la culture d'une façon plus raisonnée, et à commencer par déterminer les conditions de la survie du virus dans les diverses possibilités de milieux, température, atmosphère, effets de divers agents etc.....

<u>Etude des facteurs influençant la survie du virus aphteux dans les conditions de sa culture in vitro</u>

Les facteurs influençant favorablement la survie ne sont pas nécessairement ceux qui correspondent aux conditions optima de la multiplication du virus ; toutefois, ils donnent des éléments précieux dont il y a lieu de tenir compte. Ils ont fait l'objet de recherches détaillées de la part de BEDSON, BURBURY & MAITLAND (1925), STOCKMAN, MINETT, DAVIES & WATT (1927), BEDSON, MAITLAND & BURBURY (1927-1928), [illegible] (1926), ANDREW (1931), EDWARDS (19[illegible]), FRENKEL & VAN WAVEREN (1937-1938), BROOKSBY (1948).

Les expériences comparatives sont faites avec les mêmes souches, cultures, titrées et diluées dans des solutions déterminées, et dans les mêmes conditions. Il est certain qu'à mêmes température, pH etc... le temps de survie est proportionnel à la concentration du virus.

Température :

La température de 37° n'est pas nécessairement la plus favorable à la culture du virus. La température rectale du cobaye est de 39° et celle du bovin de 38°5 ; mais, in vivo, aux endroits de prédilection des lésions locales (muqueuses buccales, langue, onglons, pis), le virus se multiplie à une température beaucoup plus basse. Toutefois, la maladie se développe plus rapidement si l'animal est placé à une température voisine de celle du corps.

La lymphe aphteuse perd, à 30°, sa virulence en 9 jours (LOEFFLER & FROSCH) et, à 37°, en 12 à [illegible] heures (CARRE). Le virus survit 24 heures dans une lymphe diluée (CARRE). Le virus est toujours détruit, en 3 jours à 1/500 dans un milieu défavorable : une solution virulente, salée ou acide, devient rapidement inactive.

Le temps de conservation est proportionnel à l'abaissement de la température. En tampon phosphaté à pH 7,6, de la lymphe au 1/100 filtrée sur bougie Berkefeld garde sa virulence 3 jours à 37°, 9 jours à 32-34°, 25 jours à 18-20°. Dans un milieu plus complexe, à base de glucose, de sang de mouton, d'extrait de langue de veau, ou en anaérobiose, le virus, dilué à 10^{-4}, survit 6 jours à 37° et 25 jours à 18-20°.

Lumière solaire :

L'obscurité est à conseiller, car le virus s'altère rapidement à la lumière.

Concentration en ions hydrogène (pH) et intérêt des solutions tamponnées :

Tous les auteurs sont d'accord pour considérer le pH 7,5 à 7,6 comme le plus apte à la vitalité du virus aphteux <u>in vitro</u>, à 37°, ou à des températures plus basses. Le titre du virus décroît proportionnellement au temps de conservation. Cette altération de la virulence est dûe, en partie, à l'accroissement progressif de l'acidité mais le moindre changement de l'acidité ou de l'alcalinité du milieu est également nuisible à la survie du virus. Les solutions qui maintiennent une proportion constante d'ions hydrogène sont supérieures aux solutions ordinaires. L'eau distillée et les solutions de ClNa (pH 7,6) ne conviennent pas (24 h. de survie en moyenne) ; au contraire, une solution tampon phosphatée à pH 7,6 M/50 (0,27% [illegible] et 0,0[illegible]% [illegible] PO_4H[illegible]) permet la survie de 4 jours d'un virus aphteux dilué au 1/500.

Les phosphates peuvent être remplacés, par exemple, par l'acétate de potassium M/50 ou par le milieu de Pannett et Compton (1924) à base de chlorures de sodium, de potassium, de calcium, de magnésium, recommandé pour les cultures de tissu ([illegible] h. de survie).

Un milieu phosphaté à pH 6,[illegible] ne permet pas de survi[illegible]

de plus de 24 h., même à 4°. A basse température, l'importance du pH est aussi grande qu'à 37° ; l'épithélium des coussinets plantaires infectés conserve sa virulence aux pH 7 et 8 pendant 77 et 93 jours, de pH 5,4 à 6,8 les résultats sont plus irréguliers ; à 12°, le pH 7,4 est le plus favorable ; de pH 4 à pH 6,2 il ne survit que 4 jours.

La complexité d'un milieu n'exclut pas un pH adéquat : à 34°, dans un milieu phosphaté contenant 10 p. 100 de gélatine, le virus survit 9 jours à pH 7,5, il ne survit que 5 jours aux pH 6,9 et 8. Dans un milieu à 2 p. 100 de glucose, 5 p. 100 de sang de mouton et extraits de langue de bœuf, le virus survit 25 jours de plus à pH 7,6 qu'à pH 6.

Il est donc souhaitable que les milieux de culture renferment des tampons phosphatés. On peut ajouter du rouge de phénol ou du bleu de bromothymol pour suivre l'évolution du pH sans altérer la période de survie.

Tension gazeuse :

La tension d'oxygène réduite à 30 ou 50 mm. de Hg n'altère pas la période de survie. A contraire, des expériences faites avec du virus au 1/500 en milieu phosphaté M/50, à pH 7,6, conservé à 37°, montrent, dans deux essais sur quatre, une survie plus longue de 24 h. pour le virus conservé en tubes fermés après vide partiel que pour celui qui a été conservé en tubes ouverts. L'abaissement de la tension d'oxygène dans des tubes contenant du bouillon Martin, ou des milieux solides (gélose avec ou sans sérum), "ensemencé" de virus filtré, est sans action sur la survie du virus. Même résultat en remplaçant l'air par de l'hydrogène ou du gaz de houille.

Les travaux anglais semblent prouver la faible importance de la tension d'oxygène. Ils sont discutés par les auteurs américains qui, par une autre technique (action des conditions aérobies ou anaérobies sur une large surface et peu d'épaisseur, en boites de Pétri), concluent que la durée de vitalité du virus est deux fois plus grande (14 jours) en anaérobiose stricte qu'en aérobiose (7 jours). Ceci nous entraîne à envisager l'étude des échanges respiratoires du virus aphteux.

Conditions d'oxydo-réduction (rH) :

Les principales recherches des conditions d'oxydo-réduction favorisant la survie et la culture du virus aphteux sont dûes à BURBURY (1928), EDWARDS (1931), puis à HECKE (1933).

Les essais de culture du virus aphteux dans certains milieux artificiels paraissant favorables ont abouti à la mort rapide du

virus, après addition de certaines substances non nocives en elles-mêmes, par exemple l'addition de 10 p. 100 de sérum sanguin dans un bouillon détruit brusquement le virus, bien que le pH soit stabilisé à 7,5 (BEDSON & MAITLAND, 1927), or, le sérum favorise, habituellement, la culture des microorganismes pathogènes.

La survie du virus aphteux, dans un milieu, est prolongée par la présence de petits morceaux de peau, ou d'autres tissus, stériles, alors que l'acidité s'y trouve plus élevée que celle correspondant, en général, à l'optimum. On sait que les meilleurs milieux, pour certaines bactéries dont la culture s'effectue mieux sans oxygène, ou dans un milieu peu oxygéné, doivent leurs propriétés favorisantes à leur potentiel d'oxydo-réduction, symbolisé par le rH. De cette potentialité dépend l'oxydation ou la réduction des divers constituants du milieu.

EDWARDS a examiné et comparé le pH et le rH de divers milieux liquides renfermant un mélange de différentes substances, dont l'action sur la survie du virus aphteux a été expérimentalement démontrée. Ces milieux ont été éprouvés au moyen d'indicateurs colorés : pour le rH il a fait usage de certains colorants comme la safranine, l'indigo, le bleu de méthylène, qui sont colorés à l'état oxydé et se décolorent quand ils sont réduits ; il a essayé, également, les indicateurs de Clark : thionine et bleu de méthylène, indophénol I, II, III (bleus oxydés et incolores réduits ; rouges par acidification s'ils sont utilisés comme indicateurs de pH). Pour ces essais, il dilue la lymphe aphteuse au 1/50 dans une solution de phosphate M/50 à pH 7,6 et filtre à travers un disque Seitz E.K.I. Le virus est testé dans des milieux variables. L'activité est mesurée par inoculation intradermique dans le coussinet plantaire du cobaye.

Les propriétés oxydo-réductrices de quelques-uns de ces mélanges changent rapidement à l'air, il a été nécessaire de conserver les tubes à essai dans un appareil [illegible] tension d'oxygène réduite et d'assurer les conditions [illegible] suffisantes par des substances ajoutées.

Plus simplement, EDWARDS a bouché ses tubes à essai d'une couche de gélose recouverte de paraffine, pour [illegible] de l'oxygène de l'air.

In vivo :

EDWARDS a injecté, dans les tissus vivants, les indicateurs colorés seuls ou mélangés au virus aphteux.

La peau du coussinet plantaire du cobaye, lieu de prédilection du virus aphteux, a un pH de 6,5, le rH est approximativement de 17 (mesuré à l'indophénol I).

Ces résultats sont conformes à ceux recueillis par J.-André THOMAS : les cellules vitellines en voie de transformation ont un rH de 15,1 mesuré au bleu de crésyl.

In vitro :

La survie du virus aphteux n'est pas longue quand les conditions du pH et du rH du corps sont reproduites en milieux artificiels (EDWARDS) ; ceux-ci, pour permettre une bonne survie en dehors du corps, doivent avoir un pH optimum de 7 (sérum-son) avec un rH de 20.

Le tissu vivant est plus réducteur et le pH plus acide, mais il existe des changements compensateurs dans l'organisme vivant. L'imitation des conditions naturelles assure la survie du virus, mais non sa multiplication. La stabilité des milieux artificiels ne peut être obtenue qu'à l'abri de l'air. Le virus aphteux paraît avoir une tendance anaérobie vis-à-vis des aérobies stricts.

Le rH et le pH optima pour la survie du virus ne sont pas les mêmes pour les différents milieux ; de plus, le changement du potentiel d'oxydo-réduction d'environ 21 à 16, au pH constant de 7, détermine un milieu rapidement destructeur pour le virus.

EDWARDS a testé plusieurs milieux : eau distillée, sérum, infusion de foin, de son, jus d'orange, bouillon, vis-à-vis de la survie du virus aphteux, en connaissant le pH, le rH et la température. Pour éviter une modification des milieux par la chaleur (dilution de sérum, infusion de son, jus d'orange), EDWARDS les stérilise par filtration sur Seitz. Le virus survit mieux en eau distillée quand la réaction acido-basique est ajustée à pH 7,6, c'est l'extrême limite alcaline pour une bonne survie. Le degré d'alcalinité du milieu nécessaire à une survie optimum est conditionné par les besoins respiratoires du virus. Le taux de l'oxydation est plus grand dans les liquides les plus alcalins. Si le milieu contient des matières organiques, le virus peut y puiser son énergie (dans l'eau distillée c'est à partir de l'oxygène moléculaire). Le pH optimum est moins alcalin.

Si les conditions oxydo-réductrices sont convenables et restent stables, le virus peut survivre pendant une longue période. Mais, à la longue, les infusions, le sérum, ou leur mélange, [illegible] l'air, plus alcalins, par départ de CO_2, la survie devient défavorable.

Le [illegible] ajouté aux propriétés [illegible] [illegible], [illegible] par les infusions [illegible] et de foin ; ajouté au sérum, en milieu anaérobie, il est défavorable au virus aphteux à 37°. [illegible] ; en milieu plus alcalin, son mélange avec le sérum est défavorable car les substances qui augmentent le pouvoir oxydo-réducteur se trouvent dans la peptone, mais elles sont précipitées dans les solutions de sérum à pH 7 ; c'est ainsi que les résultats sont [illegible] [illegible]nce de globules rouges au mélange sérum-[illegible] [illegible] milieu à pH 7 plus réducteur et, ainsi, [illegible] survie du virus.

Généralement, quand le pouvoir [illegible] [illegible] [illegible] étroites limites [illegible] de très petites [illegible] et de rH, de chaque côté de l'optimum [illegible] sibles, et le degré le plus favorable d'[illegible] un milieu fortement réducteur, peut [illegible] dans un milieu dont les conditions [illegible] [illegible] [illegible] rus qu'en aérobiose, si le milieu est à pH 7,6 (de-[illegible] survie du virus). Mais une augmentation [illegible] tés oxydantes du milieu en présence de l'air est défavorable. A un degré moindre d'alcalinité, la [illegible] est plus longue en milieu anaérobie.

[illegible] le potentiel d'é-[illegible] [illegible] différents [illegible], par son équilibre [illegible] la tension d'[illegible] réduction [illegible] ces milieux soient [illegible] [illegible] extrait de son ou d'[illegible] [illegible] de [illegible]

pendant [illegible] montre que la cystine prolonge la vitalité du virus dans un milieu à base de sérum, alors que dans la lymphe, elle la diminue.

Temps d'incubation :

La possibilité de multiplication du virus dans des cultures artificielles, pendant des temps d'incubation prolongée, a été recherchée. A différentes tensions d'oxygène et dans différents milieux, notamment du sérum avec addition de fragments de tissus, ou pommes de terre, le virus a été incubé 6 semaines à 37° ou à 26°. Aucune réapparition de virulence n'a pu être décelée après la disparition du virus au cours des premiers jours.

Etude de l'action, sur le virus aphteux, des composants des milieux de cultures bactériologiques :

Substances protectrices :

Gélose.- FROSCH & DAHMEN ont utilisé 3 p. 100 de gélose dans leur milieu. La gélose, l'amidon également, ajoutée dans la proportion de 0,1 à 2 p. 100 dans un milieu phosphaté de pH 7,5 - 7,9, ne modifie pas la survie du virus (STOCKMANN & MINETT).

OLITSKY & BOEZ ont trouvé que 2 à 3 p. 100 de gélose ont une influence défavorable sur le virus, puisqu'ils n'obtiennent que 3 jours de survie, alors que, dans d'autres milieux, la survie est plus longue. Ils ont, dans le but d'obtenir un milieu semi-fluide, étudié de plus faibles pourcentages de gélose. En tampon phosphaté, à pH 7,6, à 34°, avec addition de 0,1 à 0,5 p. 100 de gélose, la survie du virus est de 7 jours, mais avec 0,25 p. 100, la survie est de 9 jours. L'optimum est de 0,25 p. 100 dans un milieu tamponné simple. L'addition de divers milieux organiques : peptone de Witte ou de Martin, macération de boeuf, sérum frais de mouton, liquide d'ascite, réduit la période de survie à 5 jours ; de même l'addition de lécithine, de glucose, de glycéro-phosphate et de citrate de soude.

La simplicité du milieu est favorable à la survie du virus. A 18°, en milieu tamponné à pH 7,5, avec 0,25 p. 100 de gélose, la survie du virus atteint 53 jours ; 3 repiquages, en ce même milieu, sont positifs, mais l'expérience est faussée par la présence d'un germe microbien non spécifique. La gélose semble agir par ses propriétés physiques, protégeant le virus qui ne se multiplie pas.

Gélatine.- Les aphtes de coussinets plantaires de cobayes placés à 0° dans la gélatine à 10 p. 100 sont encore virulents le 83ème jour (STOCKMANN & MINETT).

OLITSKY, TRAUM & SCHOENING ont essayé de cultiver le virus aphteux dans la gélatine à 10 p. 100, en milieu tamponné, le milieu

[illegible] ; il est nécessaire d'employer une gé[illegible] car elle pourrait contenir [illegible] tés : arsenic, cuivre, acides. A 32-34°, [illegible] [illegible] 3 si la gélatine n'est pas lavée.

L'addition de bouillon de langue de veau, de pep[illegible] [illegible] d'asperges, [illegible] est nuisible.

L'emploi de la gélatine très purifiée, préparée par la méthode de LOEB (action de l'acide acétique [illegible] permet, à [illegible] [illegible] gélatine [illegible] de l'hydrate de potassium, la survie, à 18°, peut atteindre [illegible] [illegible] les mêmes conditions) ; [illegible] peuvent être obtenus, [illegible] le 4ème échoue ; il n'y a pas multiplication, c'est [illegible] la survie est moins favorable.

En résumé, l'addition de protéines ou de subs[illegible] [illegible] nuisible ; le virus a besoin, pour vivre, d'un milieu très simple. Les conditions de survie et de multiplication sont différentes.

Substa[illegible]

La solution [illegible] aux phosphates [illegible] N/50, à pH 7,6, permet une survie de 4 à 5 jours à 37° ; il est donc naturel qu'elle ait servi de base à une série de milieux testés en vue de la survie du virus, ou de sa multiplication. Ce dernier point n'a pas été atte[illegible] [illegible] par addition de [illegible] nutritives ont fourni de très [illegible] la culture du virus aphteux [illegible]

[illegible] en lymphe de vésicules [illegible] solution saline, [illegible] p. 10 aux [illegible]

[illegible].– Les bouillons de boeuf, de langue de veau,

seuls ou additionnés par un mélange de phosphates, glucose, glycérine, extrait de leucocytes, extrait de colibacille, pommes de terre stériles, sang de lapin non chauffé, ont été testés vis-à-vis de la survie. L'addition de phosphates donne une action constante, la glycérine et les tissus paraissent un peu favorables, mais, en général, le mélange au bouillon est nuisible : il provoque une destruction rapide du virus.

Peptones.- Les peptones de Martin et de Witte sont, non seulement défavorables pour la viabilité du virus, mais elles tendent à exercer un effet destructeur quand elles sont ajoutées à un milieu qui, par lui-même, est favorable à sa protection. A 34°, la survie du virus aphteux, dans un milieu tamponné à pH 7,5, additionné de 1 p. 100 de peptone, est plus courte qu'en milieu tamponné seul. La différence du temps de survie avec les témoins (7 à 9 jours) est encore plus grande si, en plus de la peptone, le milieu renferme de la gélose ou de la gélatine (5 jours). Cette action nuisible est moins accentuée que celle du bouillon, celui-ci doit contenir un autre principe défavorable (Commission américaine).

Sérum et liquide d'ascite.- L'addition, au tampon phosphaté, de sérum de lapin, de mouton, de cobaye, de cheval ou de liquide d'ascite, a un effet nuisible sur la survie du virus à 34 ou 37° (19 à 50 h. de survie pour le sérum de cobaye).

Par ces expériences, BEDSON, MAITLAND & BURBURY (1927) sont les premiers à montrer le rôle défavorable du sérum entier généralement employé, avant eux, comme un des constituants de nombreux milieux. Le sérum et le liquide d'ascite ne donnent pas de meilleurs résultats que le bouillon ou la peptone. Par exemple, à 34°, dans un tampon phosphaté contenant 15 p. 100 de gélatine, le virus garde son activité 7 jours, alors que, dans ce même milieu, avec 10 p. 100 de sérum frais de mouton, le même virus est inactif après 3 jours d'incubation. Pour les Membres de la Commission Américaine, le sérum et le liquide d'ascite ont un effet virulicide et ne neutralisent pas l'action néfaste du bouillon. Ainsi, ces matériaux n'ont aucune valeur dans les milieux de culture du virus aphteux.

Cette action antagoniste du sérum ne semble pas associée à sa propriété antitryptique ; en effet, en chauffant le sérum à 56°, pendant 1 h., on n'altère pas ses effets nuisibles à la survie du virus aphteux, mais on réduit nettement sa valeur antitryptique. Inversement, l'addition de trypsine (qui agit sur la digestion des protéines sériques) dans les milieux contenant du sérum seul, ou mélangé avec la solution phosphatée et le bouillon, augmente la période de survie du virus aphteux. La présence de tissus animaux ou de pommes de terre n'augmente pas davantage l'action de la tryp-

sine ; mais il existe un optimum de digestion au delà duquel une digestion plus avancée du sérum produit des conditions moins favorables à la survie.

Nous savons, maintenant, par les travaux de SIMMS, que l'action défavorable des sérums est dûe à certaines substances antagonistes et non ultrafiltrantes.

<u>Autres milieux de culture</u> ne donnant pas une survie supérieure à celle obtenue par le tampon seul ; milieux à base de :

- plasma citraté de cobaye
- sang frais et bouilli ajouté au sérum et mélangé avec celui-ci et le virus, en contact avec de la gélose inclinée
- oeuf : jaune et albumen mélangés
- lait bouilli 30 minutes, à parties égales avec tampon phosphaté
- extrait de tissus d'embryon de cobaye.

<u>Addition de fragments de tissus</u>. - L'addition de petits morceaux de tissus d'embryon de cobaye ou de tissus de cobaye adulte, ou de cubes stériles de pommes de terre crue ou bouillie, au sérum seul ou mélangé avec le tampon phosphaté, augmente la survie du virus à 37° (Commission Anglaise, 1927-1928). Le sérum est indispensable car la survie dans le bouillon mélangé à la solution de Locke, n'est pas modifiée par la présence de tissus seuls.

Pour ces expériences, le sérum de lapin est moins favorable que celui de cobaye.

Contrairement au sérum qui s'alcalinise à 37°, le sérum additionné de tissus s'acidifie, peu à peu, par formation de CO_2 (respiration) formant ainsi des conditions anaérobies. Malgré un pH 7, après une incubation à 37° de 24 heures, et souvent 6,8 après 3 ou 4 jours, le virus survit mieux (45 à 95 heures) que dans un sérum pur avec pH de 7,6 (19 à 22 heures). Toutefois, la quantité de virus n'augmente pas, elle est toujours inférieure à celle des ensemencements, le titre n'est jamais supérieur à celui de départ.

Le prolongement de la survie ne peut donc être rapporté à une multiplication du virus. Les auteurs anglais n'ont obtenu aucune preuve de cette multiplication en titrant les doses minima infectantes de

"leurs cultures" à 37°, et à différentes périodes d'incubation (2, 20, 36, 44, 66 heures).

Les tissus sont choisis, par les auteurs anglais, dans les endroits de prédilection du virus aphteux : coussinet plantaire du cobaye, pis de la vache, groin du porc, muqueuse buccale, puis dans diverses régions : peau poilue, rein, rate d'embryon ou d'adulte. Les fragments de tissu ne contiennent pas plus de virus que le milieu dans lequel ils baignent.

Pour éliminer l'hypothèse d'une secrétion tissulaire, des essais ont été faits avec du sérum dans lequel les tissus ont séjourné un certain temps, puis ont été retirés. La survie est équivalente à celle observée dans le sérum non préparé. Les tissus animaux bouillis n'ont aucune action, ni sur la survie, ni sur la réaction du milieu. Des fragments d'albumine d'oeuf, coagulés par la chaleur, ont également un résultat négatif.

Certains essais, toujours effectués par les auteurs anglais, précèdent immédiatement les cultures du virus sur cultures de tissus ; ils débutent <u>in vivo</u> et se terminent <u>in vitro</u>.

Des coussinets plantaires de cobayes sont prélevés 6 heures après leur inoculation de virus et transférés dans les milieux de cultures suivants :

liquide d'ascite pH 7,6
sérum frais de cobaye pH 7,8
10 p. 100 de sérum de cobaye dans du bouillon pH 7,6
10 p. 100 de sérum dans un tampon phosphate M/50 pH 7,6
tampon phosphate M/50 pH 7,6.

Les tubes de cultures sont scellés avec de la vaseline et incubés à 37°, ou à la chambre froide. Les tubes contaminés par des bactéries sont éliminés. L'expérience montre que le virus se répand dans les milieux, aussi bien à 37° qu'à la chambre froide. A 37°, le virus disparaît, en 48 heures, du liquide environnant les coussinets plantaires. Le virus qui, à la chambre froide, avait conservé son activité, la perd en 2 ou 3 jours s'il est placé à 37°. Aucune multiplication n'est donc obtenue.

<u>Conclusion</u> :

Aucune multiplication du virus aphteux <u>in vitro</u>, dans les divers milieux sans cellules vivantes, n'est obtenue. Cependant ces travaux ont donné quelques renseignements sur les conditions nécessaires pour la conservation du virus dans des milieux artificiels.

[illegible]

deux ou plusieurs milieux, d'employer pour chacun, dans [illegible] et la même dilution, puisque les facteurs de puissance de l'agent actif, les contaminations, les concentrations variables en ions hydrogène.... peuvent donner lieu à des fautes d'interprétation.

La conservation de l'activité pendant 3 passages successifs doit être considérée comme une bonne survie du virus, mais pas nécessairement comme sa multiplication.

Les meilleures conditions de bonne survie du virus aphteux paraissent être les suivantes :

- température inférieure à 37° et obscurité
- pH de 7,[illegible] à [illegible], [illegible] à la fin de l'expérience.

[illegible] favorable. Le virus devient inactif en quelques heures à 37° dans des conditions d'aérobiose, et en quelques jours dans des conditions d'anaérobiose.

La solution tampon aux phosphates permet une survie satisfaisante.

Un milieu semi-solide, à base de 0,25 p. 100 de gélose, ou, mieux, de 10 p. 100 de gélatine -milieu protéique le plus élémentaire- peut être avantageux. L'addition de substances plus ou moins complexes, comme le glucose, le bouillon, les peptones, le sérum, les lipides... donne une survie moins longue qu'avec le simple milieu à la gélatine.

Le virus aphteux est extrêmement sensible aux petits changements des propriétés acido-basiques et oxydo-réductrices du milieu dans lequel il est placé. C'est du taux auquel les produits composant le milieu [illegible] est également soumise à la température du milieu ; à [illegible] pH et de rH, le virus ne survit que quelques jours. [illegible] pide des parties internes du corps des animaux infectés [illegible] et quelques jours dans les aphtes

c) Cultures sur les cultures de tissus :

Procédés expérimentaux :

Les résultats des essais de culture *in vivo*, *in ovo* et *in vitro* sur milieux exempts de cellules, démontrent que le virus aphteux ne peut se multiplier qu'en présence de cellules vivantes déterminées ; il ne faillit pas aux lois générales des ultra-virus et, de plus, il se montre particulièrement difficile à cultiver.

La découverte des méthodes modernes de cultures de tissus *in vitro* a donné un essor considérable à la culture des virus.

On entend par : cultures de tissus, l'explantation, en dehors de l'organisme, d'ensembles cellulaires vivants que l'on place dans un milieu nutritif capable d'assurer la survie, la croissance et la multiplication des cellules. Autrement dit c'est une méthode qui se propose d'obtenir la multiplication d'une semence placée dans un milieu convenable. Elle a pour but d'isoler des souches cellulaires pour la plupart à l'état pur, afin de les soustraire à l'influence de l'organisme. Les groupes cellulaires sont entretenus dans des conditions définies et mesurables. Les souches pures de tissus jouent le même rôle que les souches pures de microbes en bactériologie, mais elles sont beaucoup plus difficiles à obtenir.

C'est à l'aide de ces cultures cellulaires *in vitro* que l'on cultive les virus, et celles-ci n'ont été réalisées qu'au moment où l'on a compris que les virus ne pouvaient vivre et se multiplier qu'en présence de cellules vivantes. L'histoire de la culture des virus *in vitro* est donc intimement liée à celle de la culture des tissus *in vitro* (1). Le développement d'une science est tributaire de l'évolution des techniques.

Les travaux préliminaires de Paul BERT (1866), assurant, théoriquement, la possibilité de la vie indéfinie par passages en milieu renouvelé, de RANVIER (1875), de Léo LOEB (1897), puis ceux de JOLLY (1903), sur la multiplication de cellules sanguines, créant la culture des tissus d'animaux à sang froid, montraient la possibilité de cultiver des cellules de tissus dans des récipients de verre, comme pour les cultures de microbes.

HARRISSON (1907) crée la culture des tissus, en observant *in vitro* le développement de cellules nerveuses et de fibres musculaires de grenouille adulte.

---

(1) FRENKEL remarque, à juste titre, que cette culture de virus est, en réalité, une culture *in vivo* et qu'en considérant la culture du tissu, elle-même *in vitro*, il serait plus exact de parler de culture *in vitro-vivo*. La coutume a consacré le terme de culture *in vitro*.

BURROWS (1910), CARREL & BURROWS (1910) mettent au point la technique des cultures de petits fragments de tissus d'animaux à sang chaud sur plasma. CARREL ajoute, en 1912, un peu d'extrait d'embryon au plasma du milieu de culture, ce qui provoque une multiplication importante des cellules. Cette technique permet de conserver et de faire vivre indéfiniment, hors de l'organisme, des tissus d'individu. CARREL a conservé 20 ans des souches de fibroblastes provenant du coeur d'un embryon de poulet ; il est bien évident que la vie d'une poule n'est jamais aussi longue.

La culture des virus sur cultures de tissus est réalisée, pour la première fois, par STEINHARDT, ISRAELI & LAMBERT, en 1913. Le virus vaccinal est cultivé sur cellules en voie de prolifération. Les travaux préliminaires de MARCHOUX (1908), puis de LANSTEINER & BERLINER (1912-1913) ont montré l'importance des cellules vivantes pour la culture du virus de la peste aviaire. C. LEVADITI (1913) observe une survie plus longue des virus de la poliomyélite et de la rage quand les tissus infectés sont enrobés dans du plasma. PARKER & NYE (1925) inoculent des fragments de testicule de lapin avec le virus vaccinal et les cultivent sur plasma.

CARREL (1926) démontre la possibilité de la multiplication indéfinie du sarcome de Rous sur pulpe embryonnaire, fragments de rate et leucocytes, dans un plasma coagulé. CARREL & RIVERS (1927) appliquent la même méthode au virus vaccinal. A partir de 1927, le principe de la méthode est affirmé, la technique codifiée et la culture de presque tous les virus tentée.

Nous n'avons pas l'intention de traiter la culture des tissus, ou même la culture des virus sur cultures de tissus dans son ensemble (1) ; c'est un problème trop vaste qui a donné lieu à d'innombrables travaux. Les méthodes, elles-mêmes, sont très nombreuses. Les résultats des recherches ne sont pas toujours concordants, en raison de diverses complications inhérentes aux virus : invisibilité en lumière blanche, connaissances insuffisantes, difficultés de culture et de

---

(1) La culture des virus est exposée par J. WIRTH dans "Les Ultra-virus des maladies humaines", 2ème éd. 1948, publiée par C. LEVADITI & P. LEPINE. C'est une mise au point remarquable et complète.

purification, diversité des méthodes de culture. Nous nous bornerons, avant d'aborder l'étude de la culture du virus aphteux, à donner un aperçu sur les techniques et les résultats généraux des cultures de virus sur cultures de tissus.

La culture des tissus correspond à un "milieu" spécial permettant la multiplication et le repiquage, en série indéfinie, d'un virus. Ce milieu consiste en cellules maintenues vivantes en dehors de l'organisme. Le temps et la température d'incubation doivent être aptes au développement du virus. La réalisation de bonnes cultures de tissus est subordonnée à trois conditions :

- un substratum solide qui permet aux cellules de s'étaler et de se développer, par exemple coagulum de plasma,
- des échanges gazeux faciles, d'où nécessité de mettre en culture de très fins fragments de tissus enrobés dans une mince couche de plasma,
- un apport de substances nutritives et une élimination des produits toxiques assurés par l'addition de jus embryonnaire, de liquides salins, par des lavages successifs ou des repiquages (passages) fréquents des cultures dans de nouveaux milieux.

Le virus est inoculé sur les fragments de tissus en culture où il trouve les éléments de sa multiplication.

Le "milieu" de culture doit correspondre à l'affinité de chaque virus pour certaines espèces animales, certains tissus et certaines cellules.

La culture de virus sur tissus est liée à la multiplication des cellules ou à leur simple survie, d'où deux méthodes :

- méthode classique de CARREL (1912) : culture de virus sur cellules en voie de prolifération,
- méthode de M. & H. MAITLAND (1928) : culture de virus sur cellules en survie.

La vitalité des cellules en culture est différente dans les deux méthodes. Avec le procédé de CARREL, les cellules se multiplient activement grâce à l'apport de l'extrait embryonnaire ; c'est une véritable culture de tissus en milieu solide, à base de plasma. Le virus se multiplie en même temps que les cellules prolifèrent. Au contraire, avec le procédé de M. & H. MAITLAND, l'extrait embryonnaire manque. Les cellules survivent et ne se multiplient, ainsi que le virus, qu'en fonction de la présence des substances entraînées dans la culture par les fragments de tissu. Dans les deux procédés de nombreux passages de virus, par repiquages sur milieux neufs,

sont possibles. Un grand nombre de modifications de détail peuvent intervenir, nous exposerons les principales qui ont été appliquées à la culture du virus aphteux.

Techniques générales :

Que les cultures soient entreprises par n'importe quelle méthode, elles requièrent un certain nombre de points communs : locaux, asepsie, matériel, préparation des tissus, du virus, des milieux (de nutrition, de support), mise en culture, repiquage. Un bref aperçu de cette organisation générale appliquée au laboratoire de Biologie Cellulaire (Professeur J.- André THOMAS) ou au Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort (Directeur J.-P. THIERY), facilitera la compréhension de l'étude détaillée des cultures du virus aphteux.

Locaux :

Les manipulations doivent se faire dans une petite salle aseptique. L'air est filtré par un feutre huilé. Les murs et le sol sont lavés à grande eau. L'éclairage est bien dirigé, sans rayons solaires directs. L'aménagement est réduit au minimum : une armoire vitrée, une table, deux paillasses étroites avec supports divers, deux tabourets, deux becs Bunsen, une étuve à 37°. A défaut d'une telle salle, une boite vitrée, avec ouvertures protégées pour le passage des mains, du genre des boites à ensemencements d'ARMAND-DELILLE, est indispensable. La boite vitrée peut être désinfectée par une lampe à rayons ultra-violets, le dégagement d'ozone est évacué par un système de ventilation.

Le microscope, les filtres Seitz ou Chamberland, l'autoclave, le four Pasteur, la centrifugeuse, la couveuse, la glacière ..... sont situés en dehors de la salle de culture. Une petite pièce séparée est utile pour la manipulation des animaux.

à l'eau courante, puis bouilli, à plusieurs [illegible] de l'eau distillée. Il est alors passé à l'alcool, à l'éther, séché à l'étuve et enveloppé de papier.

La stérilisation en chaleur sèche (instruments, verrerie, vaseline) doit être assurée à 180° pendant 1 heure ; en chaleur humide (blouses, champs, objets de caoutchouc ou de liège, solutions salines) à 120° pendant 30 minutes.

Instruments :

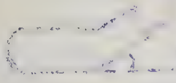
En plus des instruments d'usage courant, les couteaux, ciseaux, pinces à iridectomie sont nécessaires, ainsi qu'une presse Fischer et un broyeur de Borrel.

Verrerie :

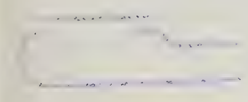
Les cultures sont faites dans des récipients variés. Les plus petites cellules à culture sont formées d'une lamelle retournée sur une lame épaisse et à concavité (méthode de la goutte pendante de HARRISON, 1907). Un autre modèle de chambre humide est constitué par des anneaux de verre de [illegible] à [illegible] cm. de diamètre lutés entre deux lames de verre.

Les flacons de Carrel ou de Borrel (méthode en flacons) permettent d'opérer sur des quantités plus grandes.

Les flacons de Carrel, en verre usuel (1923) ou très mince (1930), de différentes tailles (de 3,5 à 8 cm. de diamètre), sont plats, circulaires, avec un col oblique fermé par un bouchon de caoutchouc.



Le flacon de Borrel (1926), circulaire, de 4 à 12 cm. de diamètre, présente, sur une de ses faces planes, une ouverture à bord rodé sur laquelle on peut appliquer une rondelle de verre amovible qui sert de porte-objet. Cette rondelle est collée avec de l'albumine [illegible] par stérilisation, puis lutée à chaud à la cire molle. [illegible]



Le flacon de L. André THOMAS (1937) réunit les avantages de la culture des tissus par la méthode de la goutte pendante et par la méthode des flacons. Les liquides de la culture sont à l'abri de tout contact grâce à [illegible]. Le flacon est en verre neutre soufflé ; monté il est employé comme un flacon de Carrel, mais les cultures sont supportées par une lamelle amovible que l'on peut extraire stérilement, lorsque le couvercle supérieur du flacon est enlevé.

Les flacons d'Erlenmeyer de 25, 50 cc. et plus,

sont très souvent utilisés pour les cultures en masse. WALDMANN se sert du flacon dit "de Hiems" à fond plat.

Les boites de Pétri sont également pratiques. Ces récipients permettent un notoyage et un remplissage faciles et ils offrent l'avantage d'une large surface intérieure.

Pour les cultures en masse, certains auteurs ont adopté les boites de Roux (MAITLAND), les ballons de Kolle (FRENKEL), les fioles à toxine (J.-André THOMAS).

La culture des tissus en assez grande masse, ou [illegible] récipients qui servent de transition entre la verrerie à culture de tissus et les appareils à survie proprement dite des organes. Nous citerons les instruments de CHAMPY (1913), l'appareil de DE HAAN (1922) permettant un lavage régulier et automatique des cultures, et l'appareil de J.- André THOMAS (1937) à nacelle amovible. Ce dernier est conçu pour l'utilisation d'une, ou [illegible] de tissus et d'une quantité notable de liquide nutritif. Il permet la suppression de passages dans un milieu neuf, l'entretien facile et prolongé dans des conditions physiologiques, par l'effet d'un mélange gazeux respiratoire. Il évite un renouvellement fréquent du liquide de culture. L'observation directe, à faible grossissement, est possible. Cet appareil permet de poursuivre longtemps des cultures en masse ou des expériences de transplantation, lorsque la perfusion artérielle automatique n'est pas possible [illegible]

L'appareil, en tube, comprend une partie médiane [illegible] de réservoir à une nacelle amovible en verre, [illegible] de la culture. Les deux extrémités du tube sont [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] avec le réservoir, par un orifice percé à la partie moyenne et inférieure des deux parois longitudinales de celui-ci. Le gaz, sous pression, arrive par cette tubulure, régénère la culture,

agite le liquide, et sort par l'ampoule munie du 2ème robinet.

Préparation des milieux salins :

Liquide de Ringer :

ClNa	8,50 gr.
ClK	0,25 gr.
Cl^2Ca	0,30 gr.
H^2O	1.000 cc.

Le liquide, après stérilisation à l'autoclave a un pH de 6,5.

Liquide de Locke, modifié par Lewis :

ClNa	9,— gr.
ClK	0,42 gr.
CO^3NaH	0,20 gr.
Cl^2Ca	0,25 gr.
Glucose	2,50 gr.
H^2O	1.000 cc.

pH 7 - 7,4, se stérilise par filtrations.

Liquide de Tyrode : les sels cristallisés, chimiquement purs, doivent être dissous dans l'ordre suivant :

ClNa	8,— gr.
ClK	0,20 gr.
Cl^2Ca	0,20 gr.
Cl^2Mg 6 H^2O	0,10 gr.
PO^4H^2Na H^2O	0,05 gr.
CO^3HNa	1,— gr.
Glucose	1,— gr.
Eau bidistillée	1.000 cc.

Le pH est de 7,4. La stérilisation se fait par filtration, elle a tendance à provoquer une certaine alcalinisation ; WIRTH compense celle-ci par l'augmentation du phosphate acide de sodium (0,3 gr au lieu de 0,05 gr.)

Le liquide de Tyrode a l'inconvénient de ne se conserver que deux semaines. J.-André [illegible] conseille de préparer, pour chaque substance, des solutions-mères (en eau bidistillée), 10 fois plus concentrées. Ces solutions se conservent, non stériles, à la glacière. Le liquide est préparé au fur et à mesure de l'emploi. BORREL a préconisé un procédé de préparation qui permet la stérilisation à l'autoclave.

Solution A : comprend tous les composants sauf le bicarbonate de sodium,

Solution B : CO^3Na^2 1,26 gr.
Eau distillée 900 cc.

Ces deux solutions sont stérilisées à l'autoclave et laissées à refroidir complètement.

A la solution B on ajoute, aseptiquement, 4,35 cc. d'acide chlorhydrique titré à 10 p. 100, ce qui produit 1 gr. de bicarbonate de sodium et 0,695 gr. de chlorure de sodium. En versant la solution A dans la solution B, le liquide de Tyrode est prêt à l'emploi.

Liquide de Drew :

ClNa	9,-- gr.
Cl^2Ca	0,02 gr.
ClK	0,042 gr.
CO^3HNa	0,02 gr.
PO^4HMg	0,01 gr.
2 $(PO^4H^2)Ca$	0,01 gr.
Eau bidistillée	1.000 cc.

De pH 7,4, il est préparé et stérilisé comme le liquide de Tyrode.

Liquide de Simms

Solution A	concentration finale gr. par litre	solution mère gr. par litre
ClNa	[illegible]	160,--
ClK	0,2	4,--
$Cl^2Ca\ 2H^2O$	0,147	2,94
$Cl^2Mg\ 6H^2O$	0,203	4,06
Solution B		
CO^3HNa	1,010	20,20
PO^4HNa^2	[illegible]	4,26
Glucose	1,--	20,--
Rouge de phénol	0,05	1,--

La solution A est autoclavée. La solution B est filtrée et conservée à la glacière. Pour préparer 1 litre de milieu, verser 50 cc. de solution A dans 900 cc. d'eau bidistillée, autoclaver, puis ajouter 50 cc. de solution B filtrée.

Comme pour le liquide de Tyrode, il est bon de préparer à l'avance des solutions mères dont on prend 50 cc. de chaque composant auxquels on ajoute 500 cc. d'eau bidistillée. Cette solution, par des expériences répétées, a montré qu'elle assurait une bonne conservation des virus ; généralement son pH reste stable, ce qui est [illegible] vérifiable par la présence du rouge de phénol.

Liquide de J.-André Thomas :

Il a l'avantage d'être stérilisable à chaud et d'être un meilleur tampon que le liquide de Tyrode.

J.- André THOMAS a mis au point, en 1947, avec l'assistance de ses collaborateurs [illegible] & [illegible] un liquide physiologique synthétique, tamponné par les phosphates, qui lui a permis de conserver la survie et la cicatrisation d'organites de Triton et de Salamandre.

Cette solution, de pH 7,1, est stable, grâce à l'absence de bicarbonate de sodium, contrairement à la solution de Tyrode ; elle [illegible]. Le rapport Ca/K est de 1 [illegible]. Enfin elle peut être [illegible]. Ce liquide [illegible] fabrication des milieux de remplacement [illegible] défibriné ou du sérum.

Depuis trois ans nous l'utilisons sous la forme très pratique suivante :

Solution 1 (à répartir en fioles Pyrex de 1.000 cc.) :

[illegible]	9,[illegible] gr.
[illegible]	0,15 gr.
[illegible]	0,90 gr.
[illegible]	0,1[illegible] gr.
[illegible]	0,2[illegible]
[illegible]	0,5[illegible]
[illegible]	[illegible]0 [illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible] une [illegible]
[illegible] dans [illegible]
[illegible] sur une ampoule-stock [illegible]
[illegible] dans l'eau bidis[illegible]

[illegible] solutions 1 et 2 sont [illegible] après refroidisse-ment. [illegible], le liquide a un pH très voisin de la neutralité ; avec addition de soude et de glycine, après stérilisation, le pH est voisin de 7,5.

Ce milieu, dont la quantité de glucose peut varier à volonté (de 5 à 40 p. 100 par exemple) peut être enrichi par l'adjonction, au moment de l'emploi, d'une :

Solution 3 :

L= tryptophane	0,10 gr.
[illegible] (ClH)	[illegible],10 gr.
[illegible]	[illegible] gr.
Pyruvate de sodium	2,5 gr.
Eau bidistillée q.s.	20 cc.

Cette solution est stérilisée par passage sur filtre [illegible]. Le [illegible] est [illegible] si le milieu doit être légèrement réducteur. Il peut être remplacé par de la "réductose" (0,10 p. 100) stérilisée à l'autoclave à 110° C. pendant 30 minutes, en ampoules scellées.

Pour certaines recherches, il est parfois nécessaire de disposer d'un liquide franchement alcalin, dépassant les possibilités d'ajustement à la soude sans précipitation (au delà de pH 7,6) ; J.- André THOMAS [illegible] tampon [illegible] de glycine.

A la solution 1 dépourvue de soude et de glycine, on ajoute, après refroidissement :

solution 2 bis (stérilisée à 110° pendant 30 m.) :

[illegible]	[illegible] gr.
[illegible]	[illegible] cc.
Eau bidistillée q.s. pour	500 cc.

[illegible] laquelle on verse, avant de mélanger à la solution 1, une ampoule de gluconate de calcium et une de [illegible] ces conditions, le pH, après stérilisation, [illegible]

[illegible] composition du tampon [illegible] une [illegible] moins alcaline.

[illegible] variantes :

[illegible]

Solution 2^ter :

Glucose	5,-- gr.
Cl^2Ca anhydre	0,12 gr.
Eau bidistillée q.s.	500 cc.

On ajoute CO^3NaH 1,-- gr. à la solution 3. Le pouvoir tampon est augmenté, mais le liquide est proche du liquide de Tyrode.

au polyvinyl-pyrrolidone :

Solution 2^quater :

Glucose	5,-- gr.
Glyconate Ca	0,75 gr.
Polyvinyl-pyrrolidone	20 à 35 mg.
Eau bidistillée q.s.	500 cc.

Dans ce cas, le liquide complet (solutions 1, 2quater, 3) peut être employé seul dans certaines expériences de perfusion, non mélangé au sang ou au sérum sanguin. Il peut être très utile comme liquide de lavage préalable de la circulation. L'eau bidistillée doit être au contact de l'air ambiant depuis 3 jours, de façon que sa charge en gaz carbonique soit en équilibre ; pour les expériences délicates, comme celle de l'organisme entier, il convient d'utiliser une eau bidistillée exempte de substances pyrogènes.

Préparation des milieux organiques :

Plasma :

On se sert, pour la plupart des cultures de tissus, de plasma de coq ; [illegible] cobayes ou de grands mammifères est souvent [illegible] la culture du virus aphteux. Le prélèvement [illegible] le sang [illegible] par [illegible] au niveau de la carotide ou de la jugulaire.

Technique de J.-[illegible] : après avoir laissé l'animal à jeun pendant 24 h., son cou est déplumé et badigeonné à la teinture d'iode. Le coq est fixé sur un appareil à contention et recouvert d'un champ opératoire stérile. Dans la région moyenne du cou, on découvre une carotide et on l'isole sur 3 cm. environ. L'extrémité céphalique est liée, et une ligature non serrée est placée sur l'extrémité cardiaque ainsi qu'une petite pince hémostatique. La carotide est lavée avec du liquide de Tyrode et protégée, dessus et dessous, au moyen de compresses stériles, ne laissant apparaître que la région opératoire. La carotide est coupée aux 2/3 de son diamètre. Une petite canule de verre est introduite dans l'artère, la ligature serrée et la pince hémostatique enlevée. On recueille

10 cc. de sang par tube de verre non paraffiné. On peut avoir 60 à 100 cc. de sang si on sacrifie le coq, ou 30 cc. si on veut le conserver ; dans ce cas, on lie l'artère et on recoud la peau. Chaque tube, dès le prélèvement, est centrifugé 5 minutes, le plasma décanté et déposé au réfrigérateur dans des tubes paraffinés (paraffine 50% et vaseline 50%). Il se conserve plusieurs semaines.

Chez les mammifères, le sang est facilement prélevé par ponctions cardiaques (rats, cobayes, souris), ou par ponction de la veine jugulaire (boeuf, mouton). Il est nécessaire de recueillir le sang de mammifères en présence d'héparine, par exemple dans des tubes à centrifuger de 100 cc. contenant 2 cc. d'eau physiologique et 0,2 cc. d'une solution d'héparine à 1 p. 1.000. Les tubes, refroidis à la glace, sont centrifugés rapidement pour éviter l'hémolyse. Le plasma décanté se conserve à la glacière très longtemps.

Un autre procédé, très pratique, consiste à mélanger le plasma avec une solution hypertonique de chlorure de sodium : le plasma reste liquide, mais coagule s'il est dilué avec de l'eau (DESJARDINS, BARONI (1930), VILLEQUEZ (1937) et LAFARGUES (1945) ont appliqué ce principe à la préparation du plasma des cultures de tissus. J. André THOMAS a publié la technique suivante :

Mettre 3 parties de sang dans un tube à centrifuger contenant 1 partie du liquide physiologique tamponné de J. André Thomas, concentré 10 fois et dépourvu de [illegible] :

[illegible]	[illegible],— gr.
[illegible]	1,— gr.
[illegible]	[illegible]
[illegible]	1,20 gr.
eau bidistillée q.s.	1.000 cc

Recueillir le plasma aussitôt après une brève centrifugation, le conserver à la glacière en tubes non paraffinés. Au moment de l'emploi, la coagulation de ce plasma est provoquée par l'addition de la solution [illegible] :

Solution de [illegible] de Na à 3,75 p. 1.000	2 parties
[illegible]	1 partie

L'intérêt de ce travail est d'avoir, toute prête, la solution saline balancée de [illegible], ce qui simplifie singulièrement la mise en culture.

Sérum :

Il s'obtient, chez les mammifères, par saignée aseptique, puis coagulation du sang.

Extrait embryonnaire :

L'extrait embryonnaire de poulet est généralement considéré, depuis CARREL, comme la meilleure source de tréphones. C'est le jus obtenu par broyage d'embryons de poulets au 9ème jour d'incubation à la couveuse artificielle.

L'embryon, prélevé stérilement, est broyé à l'aide de la presse de [illegible], ou broyeur de CARREL ou, plus simplement, découpé aux ciseaux et [illegible] stérilement, pendant 5 minutes, dans un tube à centrifuger, en présence de billes de verre. Le pilonnage dans une passoire, [illegible] d'un mortier, permet à St-André [illegible] d'éliminer les substances cellulaires qui gênent les manipulations. [illegible] le broyage, ou après une macération de 30 minutes, la pulpe est centrifugée 15 minutes à 6.000 tours. Le liquide surnageant le culot cellulaire est l'extrait embryonnaire concentré ; on le dilue au moment de l'emploi [illegible] à 50 p. 100 en liquide de Tyrode (10 cc pour un embryon de poulet). Il se conserve une semaine [illegible]. Il est bon de congeler l'extrait embryonnaire pour tuer les cellules qui peuvent y demeurer malgré la centrifugation et contaminer les cultures.

Les jeunes embryons de mammifères (rats, embryon de 2 cm), souris (1 cm), lapins (3 cm) peuvent être préparés dans les mêmes conditions. [illegible] certains auteurs utilisent les extraits de muscles, de rate, de cerveau, de foetus de grands mammifères.

Préparation des fragments de tissus :

Il s'agit exclusivement de tissus embryonnaires qui doivent être prélevés stérilement. Aussitôt l'animal gravide sacrifié (saigné ou abattu dans le cas de culture du virus aphteux), l'utérus est extrait, après ligature des cornes et du col utérin. Il est désinfecté à la teinture d'iode sur toute sa surface. On peut prélever, à la pipette Pasteur, quelques cc. de liquide amniotique pour en éprouver la stérilité. L'utérus est ouvert avec le maximum de précaution. Le foetus est extrait avec des pinces fixées au niveau du cou, placé dans un cristallisoir, et introduit dans la salle de culture [illegible] la [illegible] température. La peau est découpée, par des incisions longitudinales sur le dos et [illegible]

foetus, puis arrachés soigneusement en évitant les muscles sous-jacents. Les lambeaux de peau sont placés dans un cristallisoir contenant une solution saline physiologique.

Pour la mise en culture, les fragments de tissus doivent mesurer 1 à 2 mm². Ils sont découpés aux ciseaux, au couteau à iridectomie, aux rasoirs spéciaux de WIRTH, ou, plus rapidement, au broyeur de BORREL, ou par passage sur tamis à mailles de 2 mm. Plus les morceaux sont petits, meilleure est la respiration, donc la vitalité des cellules ; au centre de gros fragments, les cellules se nécrosent. Les fragments sont lavés deux ou trois fois avec la solution physiologique, jusqu'à ce que le liquide reste clair, et conservés provisoirement dans le dernier liquide de lavage.

Préparation de la suspension virulente :

Pour les cultures du virus aphteux, la plupart des auteurs préfèrent ensemencer avec la lymphe des aphtes de la langue des bovins, ou du coussinet plantaire des cobayes. La paroi des aphtes est aussi employée, elle est broyée finement au mortier en présence de sable. La lymphe, ou le broyat d'aphtes, est diluée du 1/10 au 1/100 en solution physiologique tamponnée aux phosphates. La dilution est centrifugée, puis filtrée sur bougies Berkefeld, Chamberland, ou disques Seitz.

Le sérum et le plasma virulent peuvent servir de matériel d'inoculation. Ils sont recueillis stérilement au moment de l'élévation thermique de l'animal aphteux.

Mise en culture

La table est recouverte d'un champ stérile sur lequel on dispose le matériel stérile : porte-tubes incliné de Fischer, tubes de solution saline, plasma, jus embryonnaire. Une pipette en verre, munie d'une tétine en caoutchouc pour aspirer le liquide, est placée sur chaque tube. La boîte d'instruments, les boîtes de Pétri, la verrerie, un pot de vaseline, sont à portée de la main. L'opérateur revêt une calotte, une blouse à masque, des gants en caoutchouc, le tout stérile.

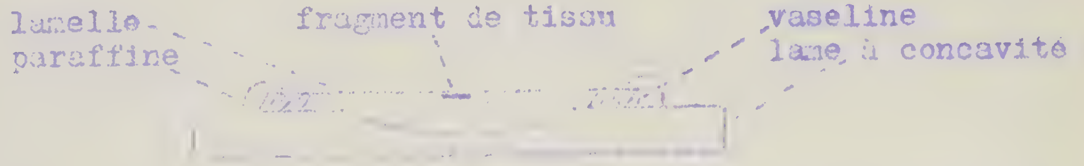
Les fragments de tissus sont mis en culture un à un, en gouttes pendantes ou en flacons. Cet ensemencement consiste à inclure un fragment de tissu dans un mélange de plasma, ou de sérum, et de solution saline physiologique. Il est ajouté ou non de l'extrait embryonnaire selon la culture désirée : multiplication ou simple survie cellulaire. Le virus est introduit dans la culture avec le tissu ou avec l'un des liquides.

Culture de virus sur cellules en voie de prolifération (Technique de CARREL et techniques dérivées) :

Culture en goutte pendante :

Technique de CARREL : Toutes les opérations doivent être pratiquées stérilement, avec le plus grand soin. Les petits fragments de tissus lavés sont mis en contact avec la solution virulente pendant 10 minutes environ.

Au centre d'une lamelle est déposée une goutte de plasma de cobaye et un fragment de tissu. Une goutte de mélange, à parties égales d'extrait embryonnaire et de solution de Tyrode, est ajoutée et brassée doucement à l'aide du couteau à iridectomie. Le fragment est replacé au centre de la lamelle. Au bout de 2 à 3 minutes, le plasma coagule sous l'action du jus embryonnaire et la fibrine emprisonne le fragment de tissu. Pendant la coagulation, les bords de la lamelle et de la concavité de la lame sont vaselinés puis mis sous le couvercle d'une boîte de Pétri pour éviter la dessication. Après coagulation, la lamelle est retournée sur la lame et ses bords sont lutés à la paraffine.



support et milieu nutritif (plasma, extrait embryonnaire et liquide physiologique)

Les lames sont placées dans une boîte de Pétri et mises à l'étuve à 37°. L'évolution de la culture de tissu peut être suivie chaque jour au microscope ; les cultures infectées ou desséchées sont éliminées. La culture croît rapidement, elle double de surface en 48 heures. Au bout de 2 à 4 jours, le milieu nutritif est épuisé, les déchets produits par le métabolisme s'accumulent et exercent une

[illegible], le plas-
ma commence à se liquéfier. Le repiquage doit se faire aussi correctement que la mise en culture. La lamelle est soulevée à l'aide d'un couteau légèrement [illegible] sur un champ stérile. Le plasma coagulé est séparé de la [illegible] qui est découpée, au couteau, en fragments carrés ; ceux-ci sont transportés dans un bain de liquide physiologique où ils restent 5 à 10 minutes, [illegible] chacun d'eux est mis en culture selon la technique précédente.

[illegible] les cultures de virus il est préférable, [illegible] repiquages, de ne pas utiliser le fragment de tissu infecté, on en extrait, par broyage, le vi- [illegible]. Ce virus peut être titré, en même temps, par [illegible]lation aux animaux sensibles.

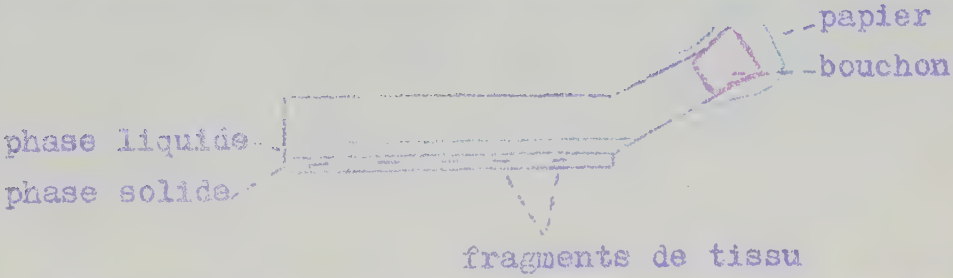
Cette méthode [illegible] a l'avantage de permettre des examens histologiques avec micros- [illegible] l'obser- vation continue de souches pures, pendant de longues années. Sur ces souches pures, il est possible de cultiver les virus. Les passages sont faciles et [illegible]cis. On peut reprocher à la méthode la nécessité de repiquages fréquents, son rendement infime en vi- rus, et la présence du plasma qui peut inhiber les [illegible].

[illegible]

[illegible] est [illegible] [illegible] [illegible]gmenter ou diminuer, la quantité [illegible] de le remplacer par du milieu neuf, [illegible] prolongée des cultures, [illegible], de la différencia- [illegible] cellulaire [illegible] quantité importan- [illegible]

[illegible] goutte [illegible] identiques, seuls les [illegible] et les récipients changent. [illegible] on introduit 0,6 cc. [illegible] d'extrait embryonnaire dilué [illegible]

du flacon, on place quelques fragments à mettre en culture. Lorsque la coagulation est terminée, on peut ajouter 1,2 cc. d'extrait embryonnaire dilué au [illegible] en liquide nutritif de composition connue.



Les repiquages ne sont pas indispensables au bout de 2 ou 3 jours, il suffit de remplacer la phase liquide de l'extrait embryonnaire dilué.

Pour les repiquages de virus, la culture est broyée stérilement en présence de sable, diluée dans le liquide de culture, ou du liquide physiologique tamponné, et centrifugée. Le liquide surnageant sert à ensemencer de nouvelles cultures.

CARREL & RIVERS (1927) ont ainsi cultivé le virus vaccinal dans des flacons contenant de 2 à 15 cc. de milieu solide.

Technique de BORREL (1925). BORREL & MÜLLER (1926) ont mis au point une méthode de culture de tissus inspirée des méthodes bactériologiques. Leurs essais furent entrepris pour l'examen de cellules centrifugées, en couche mince, étalées au contact du verre. Par la suite, BORREL essaya de cultiver et d'observer le virus aphteux.

Les tissus sont divisés par le broyeur de Borrel et lavés dans le liquide de Tyrode pour éliminer l'hémoglobine d'action néfaste sur les cultures. Avec une pipette, on introduit 1 cc. de liquide de Tyrode additionné d'extrait embryonnaire à 20 p. 100 tenant en suspension de nombreux fragments tissulaires, ceux-ci se sédimentent lorsqu'ils sont en contact avec la lame de verre, on fait tomber une dizaine de gouttes de plasma, le caillot qui se forme maintient les tissus au contact du verre. On peut recouvrir la culture d'une solution d'extrait embryonnaire en liquide de Tyrode renouvelée toutes les 24 ou 48 heures.

Les cellules se multiplient bien mais elles ne sont pas isolées à l'état pur. Les cultures contiennent surtout des fibroblastes. Il y a plusieurs [illegible] la croissance cellulaire, d'où l'intérêt de cette technique pour la culture, en faible quantité, des virus.

Technique de VILLEMIN ([illegible]). Elle est appliquée à la culture des virus en assez grande quantité.

VILLEQUEZ utilise le plasma de mammifère en liquide de Tyrode hypertonique (5 cc. de liquide de Tyrode 10 fois concentré pour 20 cc. de sang). Pour la mise en culture, il ramène ce plasma à l'isotonie en ajoutant 2 cc. de solution bicarbonatée au 1/1000 pour 1 cc. de plasma humain hypertonique. On introduit 10 cc. du mélange dans un ballon de 100 à 250 cc., puis 2 cc. de tissu et le virus à cultiver. Le tissu est généralement du testicule divisé par le broyeur de Borrel et lavé dans du liquide de Tyrode. La coagulation se produit en 8 à 10 minutes. Sur le caillot, on fait couler 2 à 5 cc. d'extrait embryonnaire dilué dans 5 cc. de liquide de Tyrode.

Technique de J.-André THOMAS. C'est un procédé simplifié adapté principalement aux cultures de tissus d'organes en survie.

Le plasma de grand mammifère (bovidé par exemple) est recueilli en liquide physiologique de J.-André Thomas 10 fois concentré. Au moment de l'emploi, il suffit de mélanger 1 partie de plasma hypertonique à 2 parties d'une solution de gluconate de calcium à 0,75 p. 1000 pour rendre le mélange isotonique et coagulable.

Les petits fragments de tissus de foetus bovins, finement découpés, sont lavés dans le liquide physiologique non concentré, puis ensemencés en flacons de Carrel dans le plasma préparé (par exemple par flacon de Carrel : 10 gouttes de plasma hypertonique et 20 gouttes de solution calcique). Il ne reste plus qu'à ajouter quelques gouttes d'une solution d'extraits d'organes embryonnaires (rate, thymus, coeur... de foetus de bovin).

Il est souvent nécessaire d'observer les cultures d'une façon prolongée, à température constante, avec un microscope. Dans ce but, J.-André THOMAS (1936) a imaginé une petite étuve métallique, réglable, qui s'adapte sur un microscope renversé. L'étuve peut recevoir des lames pour culture en gouttes pendantes, et des flacons de Carrel. A l'aide d'un double chariot mobile, la mise au point est [illegible] rieur de l'étuve. Ce dispositif rend [illegible] vices pour l'observation des cellules [illegible] l'image peut être projetée sur un [illegible] ou cinématographie.

Culture de virus sur cellules [illegible] [illegible] publications [illegible]
des simplifiées de [illegible] [illegible] :

Abandonnons l'étude des cultures in vitro des virus sur cultures de tissus faites selon le type classique pour envisager celle des cultures sur méthodes simplifiées. [illegible] a réussi de telles cultures [illegible] [illegible] multiplication des virus, la croissance des cellules [illegible] pas nécessaire, mais seulement leur survie [illegible] de [illegible] [illegible] les virus [illegible] utilisent les cellules en [illegible] multiplication est limitée à leur propre [illegible] résiduelle. [illegible] dans une véritable culture de tissus, [illegible] [illegible] [illegible] la multiplication cellulaire [illegible] dans la culture [illegible] les tissus eux-mêmes.

Cette méthode a [illegible] [illegible] biologiques des virus, de leurs affinités cellulaires [illegible] leur culture [illegible] [illegible]

Les cultures sont généralement [illegible] de plasma [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] seuls les virus sont cultivés.

[illegible]

Le principe de la méthode [illegible] culture d'un virus [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible]

M. & H. MAITLAND ont obtenu de notables résultats en particulier pour la culture du virus vaccinal (1928) et du virus aphteux (1931). Par ce procédé un grand nombre de virus ont été cultivés.

En vue d'améliorer leur méthode, les recherches ont évolué dans deux directions : l'une pour une simplification et une réduction des composants, l'autre vers une meilleure composition du milieu.

Dans le premier groupe, nous citerons la méthode de HAAGEN (1928) en goutte pendante : une goutte de plasma et de virus vaccinal ou herpétique, par exemple, englobe du tissu testiculaire (lapin) ou embryonnaire. Cette méthode, sans prétention quantitative, permet d'entretenir les souches de virus.

PARKER (1936) maintient en état de survie fonctionnelle, ou de prolifération faible, une assez grande quantité de tissus adultes dans un milieu liquide comme le sérum. Il se sert des flacons de grande capacité indiqués par CARREL ; dans ceux-ci il introduit, journellement, un mélange gazeux dont la composition est connue.

Avec la méthode de RIVERS (1930) on arrive à la plus grande simplicité, puisque le sérum est supprimé : la culture consiste en 0,1 gr. de tissus hachés (principalement d'embryon entier de poulet ou de la-[illegible] dans du liquide de Tyrode (4-5 cc.). C'est une mé-[illegible] cultiver les virus de la vaccine et de la peste aviaire.

[illegible] groupe, l'amélioration des mi-[illegible] (1936) avec STILLMANN (1937), [illegible] collaborateurs, de très [illegible] culture des virus dirigée [illegible] production de vaccin. [illegible] l'emploi du sérum bovin ultrafiltré. Ce procédé fait l'objet d'une étude particulière de notre part pour la culture du virus aphteux, il sera étudié en détail dans un cha-[illegible]

Pour GORET (1947) certains savants n'ont pas abandonné l'espoir de cultiver des virus sur des milieux exempts de cellules vivantes, malgré "le dogme "quasi [illegible] du cytotropisme et du biotropisme".

[illegible] (193[illegible]) [illegible] la transformation de virus animaux [illegible] en formes microbiennes [illegible] [illegible] des virus [illegible] la production de virus à partir de [illegible] Il [illegible] sur la rupture qu'il aurait provoquée de la liaison très [illegible] entre les virus et les protéines animales.

Cultures par des méthodes diverses :

A côté des méthodes classiques que nous venons de décrire, il importe de citer des méthodes modernes qui servent depuis une dizaine d'années à cultiver des virus ; à notre connaissance elles n'ont pas été essayées pour la culture du virus aphteux.

Méthode des tubes roulants (roller-tubes) :

Cette méthode décrite par GEY (1933) dont CARREL (1913) puis LOWENSTÄDT (1925) eurent également l'idée, permet de cultiver des tissus abondants dans des tubes horizontaux à rotation axiale. Elle a servi, d'abord, à entretenir des cultures de cellules cancéreuses, puis à cultiver le virus de la maladie de Nicolas-Favre (GEY & BANG, 1939).

La paroi interne des tubes de verre sert de support aux cultures. Celles-ci forment une couche mince composée de 40 p. 100 de plasma de poule, 40 p. 100 de sérum humain (provenant du sang du cordon ombilical prélevé à la naissance), 10 p. 100 d'extrait embryonnaire bovin et 10 p. 100 d'une solution physiologique équilibrée. Par tube, une vingtaine de fragments de tissus sont inclus dans le coagulum. Une petite quantité de même milieu (sauf le plasma) est introduite dans chaque tube. Ces tubes sont bou[illegible] dans un appareil rotatif [illegible] levé périodiquement et remplacé par du milieu neuf. Les repiquages sont supprimés.

Cette technique permet d'entretenir une multiplication continue [illegible] de la vaccine, de la grippe et de la psittacose ont été cultivés ainsi.

Ce procédé, pratique et économique, est appelé à un développement important car il permet une récolte abondante de virus avec le minimum de milieu nutritif, un rajeunissement de la culture sans repiquage proprement dit, un examen facile des tissus infectés à l'état vivant.

La nouvelle technique de "culture agitée et aérée" de MITCHELL (1949) se rapproche de celle des "roller-tubes" ; un courant d'air passe à travers un ballon animé d'un mouvement de rotation.

Méthode de la gélose-tissus :

Le virus croît dans de fins fragments de tissus, en prolifération résiduelle, étalés sur de la gélose. Les déchets du métabolisme diffusent rapidement dans ce substratum semi-solide.

ZINSSER, [illegible] et FITZ PATRICK (1937) qui ont imaginé cette technique préparent la gélose inclinée en mélangeant :

150 cc. d'une solution de gélose à 4 p. 100 dans l'eau distillée à 45°
150 cc. de liquide de Tyrode (à double concentration mais seulement [illegible] gr. p. 1.000 de bicarbonate de [illegible]),
[illegible] de sérum de cheval,
[illegible] de rouge de phénol

[illegible] à raison de 8 cc. par tube [illegible] refroidissement.

Le tis[illegible] présence de la suspension virulente [illegible] sont déposés à la surface de la gé[illegible]ages se font par prélèvement des fr[illegible] en présence de tissus frais [illegible]elles géloses. Il n'y a pas [illegible] mais seulement du virus.

[illegible] cultivé des rickettsies [illegible]les, de la vaccine, de l'her[illegible]ages. TENBROECK (1941) a comparé cette méthode à celle de MAITLAND et à celle de la greffe de [illegible]u sur chorio-allantoïde pour la culture [illegible] de la peste porcine. Il obtient, avec la [illegible] gélose-tissus qu'il considère comme la meilleure [illegible] passages avec un virus titré à 10^{-6}.

YAMAMURA & MEYER (1941) remplacent la solution de Tyrode par celle de Simms, ils cultivent le virus de l[illegible] un rendement important.

Cette méthode a fait ses preuves ; sa simplicité

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Cette [illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

qui résulte ... d'un caill...
5 cc. de plasma et 5 cc. d'extrait ...
broyat de poulet ...
embryonnaire, ... en 5% ...
enrichies, de ... La ...
... le liquide de ...
... sont ...
... méthode ... l'origine ...
... contenant ...
... l'intérêt de préparer le milieu ...
... réfléchie ... support (...)

37°. Il y a culture car : le titre du virus de départ est 1.10^{-4} il est de 1.10^{-4} au 250ème passage après avoir été dilué 5.10^{-250}.
- les passages sont effectués tous les 3 jours (1 cc. de culture dans 4 cc. de milieu neuf), le virus est donc resté 750 jours à 37°, temps très supérieur à celui de la vitalité du virus à cette température,
- PLOTZ réfute l'hypothèse de transplantation de cellules ou l'ensemencement [illegible] car, d'une part, le virus tue les cellules dans lesquelles il se développe et, d'autre part sur le jeu des repiquages, avec des dilutions successives, il n'y a plus une seule cellule d'origine au [illegible]ème repiquage ; par le même raisonnement, si le virus est considéré comme un grain de matière inerte, s'il y a [illegible] éléments virulents dans la première culture, au [illegible]ème passage il n'y a [illegible] probabilité pour qu'un élément initial soit présent,
- les résultats sont concordants, différents expérimentateurs, pour d'autres virus et diverses techniques, publient des courbes de prolifération de même sens.

Evolution de la multiplication du virus au cours d'une culture :

sans repiquage :

Dans le cas où toutes les conditions favorables sont réunies, le temps d'incubation (latence) du virus, entre l'infection de la culture et le début de la multiplication, est très court : quelques heures le plus souvent. La culture du virus est rapide, la période de multiplication du virus dure de 2 à 8 jours. Le temps pendant lequel le titre est le plus élevé se maintient de 1 à 3 jours. La virulence diminue progressivement au cours d'une période qui peut être longue. Cette évolution est calquée sur celle de la culture d'un microbe visible dans un milieu artificiel.

La culture est naturellement sujette à de nombreuses variations qui dépendent de divers facteurs : quantité inoculée au départ, virulence, infectuosité, affinités du virus ; température, constitution du milieu, pH, respiration, rH, rapport quantitatif des composants de la culture, présence d'extrait embryonnaire, quantité de cellules.

La quantité de virus d'inoculation de la culture n'est pas en rapport avec [illegible]

La technique doit être adaptée aux exigences du virus que l'on veut cultiver. Le choix du tissu à cultiver est primordial car le virus a une affinité très stricte pour certaines cellules. En général, les tissus embryonnaires semblent plus aptes à la culture des virus que les tissus adultes. Les cellules embryonnaires ou testiculaires en voie de multiplication active donnent des titres de virus plus élevés que les cellules adultes en vie ralentie.

La prolifération des virus influence la vitalité cellulaire

[illegible]

[illegible] ... une trop grande quantité [illegible] ... culture [illegible] ... Si on ajoute [illegible] ... de virus obtenu n'est pas plus grande [illegible]

Le virus [illegible] ... cultures [illegible] ... La vitalité des cellules [illegible] ... plus. Ils survivent seulement quel[illegible] ... cellules meurent pour [illegible]

[illegible] ... cellules qui ne se multiplient plus. La vitalité [illegible] ... [illegible] sur la quantité [illegible]

[illegible] ... cellules [illegible] virus [illegible]

[illegible]

[illegible] ... cellules [illegible]

du virus [illegible]

[illegible]

lavage de la culture virulente, moment du repiquage (le meilleur est celui de l'activité maximum de la culture, le plus souvent du 2 au 5ème jour), technique du repiquage (filtrat ou broyat de la culture, transfert du tissu ou du milieu liquide), quantité de virus transplantée, dilution et conservation de la suspension virulente, nombre des cellules infectées au départ, tissu (le plasma constitue une barrière à la diffusion du virus).

Rendement : Pour certains virus, le titre au début des séries de cultures peut augmenter, par exemple être multiplié de 10 à 1.000 fois (virus vaccinal), (d'après les techniques de MAITLAND), mais, en général, ce titre baisse.

Au point de vue rendement en poids de virus, les différentes méthodes à retenir sont surtout celles de MAITLAND et ses dérivées, celle de RIVERS entre autres. Les poids sont minimes. Les cultures doivent être faites par petites quantités et sous faible épaisseur pour faciliter la respiration tissulaire et éviter la nécrose. Les essais de cultures en grands flacons (ROUX) n'ont pas été heureux; il vaut mieux multiplier le nombre des petits flacons, mais les manipulations déjà très délicates sont plus nombreuses et facilitent l'infection.

Résultats qualitatifs :

Les qualités d'un virus sont définies par les différents pouvoirs de son activité pathogène : virulence, infectiosité, spécificité, affinité, vitalité, ou de son pouvoir immunisant.

Nous allons examiner les variations de ces qualités au cours des cultures _in vitro_.

Les activités d'un virus de culture peuvent rester identiques à celles du virus naturel, au cours des premiers passages. La virulence peut ensuite diminuer, progressivement, alors que l'affinité cellulaire et le pouvoir immunisant sont conservés (virus de la peste aviaire, HOTI, 1934). Au cours de nombreuses expériences, des variations, dont il est difficile d'affirmer la généralité, sont apparues ; chaque virus, chaque technique, apportent des résultats souvent différents, quelquefois même contradictoires.

Variations de la virulence : (1)

Facteurs de variations - stabilité des virus, des souches, des variétés.

Il faut un grand nombre de passages pour observer une varia-

---

(1) "Ces conclusions ne doivent être généralisées qu'avec prudence" écrit WIRTH dans sa publication sur la Culture des Virus du Traité de LEVADITI & LEPINE, auquel nous avons emprunté le principal de ce chapitre. Il s'agit, en effet, de résultats de travaux pour la plupart isolés.

tion de la virulence, cette variation est proportionnelle au nombre de passages, elle n'est souvent décelable qu'au bout d'une cinquantaine de passages.

[illegible] avant d'être entretenue sur embryon de poulet sans [illegible]

Selon les virus, leur stabilité est variable, le virus de la leucémie des poules perd sa virulence en moins de 10 passages, alors que celui de la chorio-méningite lymphocytaire ne perd pas ses qualités, pour la souris, après 50 passages. La stabilité des variations est plus ou moins solide, elles sont souvent réversibles.

Les souches d'un même virus n'ont parfois pas la même aptitude à cultiver, surtout si elles sont de virulences différentes, le virus aphteux, entre autres, présente cette particularité. De plus, les souches d'un même virus peuvent présenter des variations différentes au cours des passages.

Les variations peuvent être facilitées par une modification des facteurs physico-chimiques des cultures. Malgré ses variations, un virus conserve une certaine stabilité puisqu'il garde son pouvoir d'interférer (1) avec d'autres souches.

En général, le titre d'un virus diminue progressivement pour se maintenir en plateau à un taux inférieur à celui d'ensemencement. FLOTZ constate que le titre de départ de 10^{-7} de son virus de peste aviaire diminue rapidement à 10^{-6}, se maintient 3 ans, puis atteint 10^{-2} au bout de 5 ans. Généralement le passage sur animaux sensibles est obligatoire pour retrouver un titre élevé (RIVERS).

---

(1) L'infection d'un organisme vivant par un virus peut, dans certaines conditions, rendre cet organisme réfractaire à une nouvelle infection due à un virus différent. Cette protection temporaire, différente de l'immunité, est généralement désignée sous le nom d'interférence (SABIN, 1946)

Cultivé en milieu favorable, un virus peut varier sans modification de son titre. Le virus vaccinal cultivé à travers [illegible] passages sur tissus de poulet conserve son titre, mais perd sa virulence pour le lapin et [illegible] pour l'homme. ([illegible], [illegible] et 1935, puis [illegible], 1934). Même exemple pour le virus aphteux cultivé sur peau : il conserve son titre mais perd son pouvoir de généralisation (STRIEGLER & NAGEL, 1935).

Variations d'affinités pour les tissus et les cellules :

Certains virus ont une spécificité large : ils cultivent sur de nombreux tissus, par exemple le virus vaccinal sur testicule, rein, broyage d'embryon..., alors que d'autres ont des exigences plus précises, ils ne cultivent que sur certains tissus de certains organes (épithélium de la peau pour le virus aphteux).

En général, pour réussir une culture de virus sur des organes adultes, il faut prendre les organes appropriés d'un animal réceptif ; au contraire, sur tissu embryonnaire, la réceptivité naturelle du tissu, ou de l'animal, n'est pas toujours nécessaire ; les virus ont une grande affinité pour les tissus embryonnaires, peut-être en raison des mitoses et des facteurs de croissance.

Les cultures d'un virus sur différents tissus d'un même animal peuvent entraîner des variations : par exemple la virulence du virus de la peste aviaire augmente par culture sur le tissu nerveux, diminue sur le tissu cutané, disparaît sur le tissu hépatique.

Par culture sur un tissu d'une espèce naturellement insensible mais réceptive, la virulence d'un virus augmente pour ce tissu mais diminue pour le tissu d'origine. En effet, KÖBE & FERTIG [illegible] que le virus aphteux cultivé sur cellules épithéliales [illegible] de l'iris ne se multiplie plus sur peau de cobaye.

La virulence d'un virus cultivé sur un tissu qui lui est peu réceptif peut diminuer pour les tissus classiques, sans pour cela augmenter pour le tissu nouveau.

La virulence peut diminuer par culture sur le tissu hépatique ou la bile. Comme le bacille tuberculeux cultivé sur milieu bilié (B.C.G.), le virus de la peste aviaire cultivé sur du foie de poulet devient peu virulent, mais garde son pouvoir antigénique (HALLAUER, [illegible]).

En l'absence de son tissu favori, un virus de culture peut développer une autre affinité. Le virus de la peste aviaire cultivé sur embryon privé de système nerveux central produit des broncho-pneumonies (HALLAUER, [illegible]).

L'affinité de nombreux virus pour le tissu nerveux (neurotropisme) est facile à augmenter ou diminuer selon que la culture est faite ou non sur tissu nerveux. Ce caractère se retrouve pour les virus de l'herpès, de la fièvre jaune, de la peste aviaire, de l'encéphalite du Nil.....

L'affinité cellulaire peut être poussée à un degré très élevé puisque certaines cellules nerveuses, parmi d'autres cellules nerveuses, peuvent être seules infectées ; une souche du virus de la poliomyélite adaptée à la Souris, par de nombreux passages sur cerveau embryonnaire de Souris, ne produit plus de paralysies, comme au début des passages, mais des encéphalites.

Variations d'affinités pour les espèces animales :

Bien des virus ne cultivent que sur certaines espèces animales (le virus aphteux cultive sur tissus de Cobaye ou de Bovin et non sur tissus de poulet), alors que d'autres virus sont moins exigeants et cultivent sur des espèces non réceptives naturellement (virus vaccinal : lapin, poulet ....). Si la culture du virus est faite sur les tissus d'un animal très réceptif, la virulence est conservée pour cet animal ou s'atténue moins rapidement qu'en culture sur des tissus d'un animal moins réceptif.

Par culture <u>in vitro</u> un virus peut s'adapter sur tissus d'un animal non réceptif ; une telle adaptation est généralement impossible <u>in vivo</u>, par exemple le virus de la peste aviaire peut être adapté <u>in vitro</u> aux tissus de souris (HALLAUER, 1938) et aux tissus embryonnaires de canard. Le virus cultivé garde ses propriétés d'origine, ainsi le virus aviaire, cultivé <u>in vitro</u> sur tissus de canard, conserve sa virulence <u>in vivo</u> pour la poule mais ne l'acquiert pas pour le canard. L'espèce animale des cellules embryonnaires en présence desquelles le virus de la peste aviaire est cultivé n'intervient pas dans l'action spécifique de ce virus (PLOTZ, 1933).

Les tissus d'embryons de poulet semblent faciliter les variations, peut-être en raison de leur richesse en tréphones ou en acides nucléiques.

Un virus adapté à une certaine espèce animale, cultivé sur le tissu d'une autre espèce animale peut

avoir sa virulence simultanément diminuée ou augmentée pour d'autres tissus étrangers. C'est l'exemple donné par la souche D. 17 du virus de la fièvre jaune cultivée *in vitro* [illegible] sur embryon de poulet [illegible] [illegible] [illegible] verte d'un vaccin à partir d'un virus cultivé *in vitro*.

[illegible] traîne, parfois, le même résultat pour d'autres animaux du même ordre. Le virus de la fièvre jaune passé sur tissus de souris passe sur tissus de cobaye (LOYD, THEILER & RICI, 1936). Le virus de la poliomyélite [illegible] seulement pour la souris, mais aussi pour le rat et le cobaye (JUNGEBLUT & SANDERS, 1940).

L'affinité cellulaire l'emporte sur l'affinité envers l'espèce animale [illegible] rus pour le même [illegible] (HALLAUER, 1935).

Dissociation des affinités :

Les variations de [illegible] différentes affinités :

- d'espèces : le virus vaccinal [illegible] sue de poulet, perd sa virulence [illegible] pour l'homme,
- de tissus [illegible] herpétique, [illegible] de lapin
- le titre et la [illegible] le virus aphteux conserve son titre, alors que son pouvoir de [illegible]

Variations du pouvoir antigénique

On a considéré, longtemps, d'après les travaux de PLOTZ sur la peste aviaire, qu'un virus en culture, malgré la diminution de [illegible] gement de son pouvoir antigénique. [illegible] (THEILER & SMITH, 1937), du myxome du lapin, de la poliomyélite, de la grippe, de la fièvre aphteuse [illegible] avec plus ou moins de régularité [illegible] immunisent l'un vis-à-vis de l'autre. Le sérum [illegible] nisé avec un virus naturel neutralise le vi[illegible] proquement (peste [illegible])

Cette variation est d'une importance capitale pour l'obtention de vaccins parfaits, efficaces, à partir d'une souche de virus vivant, non pathogène mais immunisante. Pratiquement, seule la souche D. 17 de la fièvre jaune permet une telle vaccination.

A la suite d'un très grand nombre de passages, pendant des années, la variation de virulence peut s'accompagner d'une diminution puis de la perte du pouvoir antigénique. Cette grave constatation, pour l'avenir de tels vaccins, a été contrôlée par RIVERS, WARD & BAIRD (1939) pour le virus vaccinal, et par SOPER, SMITH & PENNA (1939) pour la souche D. 17 du virus de la fièvre jaune.

Conclusions :

La virulence des virus en culture de tissus suit les lois générales de l'évolution ; les affinités sont loin d'être fixées, elles s'adaptent, avec une grande facilité, aux conditions du milieu, aux tissus offerts aux virus comme support et nourriture. Les variations paraissent se produire plus facilement _in vitro_ qu'_in vivo_. Contrairement à la virulence, le pouvoir antigénique des virus reste stable beaucoup plus longtemps, mais il peut aussi s'atténuer. Ces conclusions sont intéressantes pour les recherches sur la production de souches atténuées vaccinantes.

Applications pratiques de la culture des virus _in vitro_ :

- Conservation de souches pures de virus,
- Modifications des virus dirigées dans des buts précis (atténuation ou augmentation de la virulence, obtention de virus "fixe"...)
- Production de souches de virus en grande quantité, bactériologiquement stériles. Ces souches, atténuées ou non, peuvent servir de vaccins, de matériel antigène pour hyperimmuniser les animaux ou à la fabrication de vaccins,
- Titrage des virus. Les cultures sont quelquefois plus sensibles que l'inoculation aux animaux : élimination des facteurs individuels inhérents à l'animal, simplicité, rapidité, économie,
- Diagnostic. Isolement de virus pour confirmer un diagnostic ou établir l'étiologie d'une maladie inconnue,

- Facilité de répétition des expériences. Etude des modalités d'inoculation du virus et de divers facteurs : alimentaires, respiratoires. Elimination des contaminations secondaires. Possibilité de poursuivre les expériences sans limitation de temps,

- Etudes histologiques : observation des virus, des altérations et inclusions cellulaires, processus de leur formation par examen des cultures, par la lumière blanche ou ultraviolette, sur fond noir, en contraste de phase ; à l'état vivant avec ou sans colorations vitales ; après fixation suivie de coloration des cultures en masse (examen à l'ultropak) ou en coupes (après inclusion) ; après fixation spéciale et montage au microscope électronique,

- Etudes immunologiques :

  possibilité de cultiver les virus sur des organes et espèces non réceptifs _in vivo_, élimination des facteurs nerveux, humoraux, de l'organisme,

  étude de la formation d'anticorps par les tissus en cultures : substances virulicides, agglutinines, précipitines....,

  étude de l'action des anticorps : possibilité de culture des virus sur des tissus (même du système réticulo-endothélial, leucocytes) d'animaux immunisés. Séparation possible du virus actif dans un mélange virus-sérum immun, lui-même sans activité....

- Etude de l'interférence entre différents virus,

- Recherches systématiques de l'influence de différentes substances : agents physico-chimiques, oligo-éléments, antibiotiques, sulfamides... sur les virus.

[illegible]

[illegible] de poids [illegible] embryonnaire. Le virus [illegible] 2 passages. Les passages [illegible] rieurs sont négatifs [illegible]

[illegible] Erlenmeyer [illegible]

[illegible]

[illegible]

à 1,4 cc. de filtrat de virus et laissés 30 minutes à l'étuve. Il ajoute 11,9 cc. de solution saline et met, en flacons de Carrel, 1,4 cc. du mélange avec 0,7 cc. de plasma hépariné de cobaye et 0,2 cc. d'extrait embryonnaire de poulet. Les flacons sont fermés et scellés avec de la gomme arabique et placés à l'étuve.

Le repiquage du virus s'opère tous les 5 jours environ, par broyage au sable des cultures, puis dilution dans l'extrait d'embryon. Le liquide, obtenu par la centrifugation de ce mélange, est filtré et sert ensuite à inoculer les milieux de cultures.

Le virus se multiplie pendant les premiers jours, puis il diminue et est détruit; cette destruction du virus est probablement due à des lésions de nécrose secondaires à l'accumulation des déchets du métabolisme, souvent acides. A 37° ces altérations sont plus précoces qu'à 30° ; comme le virus croît aussi bien aux deux températures, il vaut mieux cultiver à 30° ; à 26°, la multiplication est très faible.

HECKE a obtenu ses premières multiplications de virus avec des tissus épithéliaux de foetus de cobayes : peau, puis poumon et oesophage. Les foetus, extraits aseptiquement de l'utérus, doivent peser de 12 à 18 grammes, le poil doit commencer à pousser ; s'ils sont trop jeunes les cultures de tissus donnent un développement trop important de fibroblastes peu favorables, le virus disparaît plus vite.

Le cerveau foetal de cobaye permet une certaine croissance du virus, la glande parotide et les muscles sont impropres. Les tissus d'embryons de poulets sont inutilisables. Le tissu testiculaire de cobaye adulte donne des cultures de virus, mais lentes et limitées, puisqu'elles se sont arrêtées au 8ème passage (55 jours). Dans tous les cas, le développement du virus aphteux ne s'observe qu'en présence de tissu épithélial vivant.

Avec les tissus de peau embryonnaire de cobaye, HECKE a réalisé d'assez nombreux passages en série. Généralement ses cultures, à 30 ou à 37°, sont détruites entre le 46ème (12 passages) et le 49ème jour (11 passages). Dans une expérience, à 30°, il poursuit une culture pendant 17 repiquages (81 jours). La série peut être entretenue encore plus longtemps si, lors des repiquages, la suspension virulente est très peu diluée. Dans ce cas, une culture a pu persister au cours de 22 passages (131 jours), une autre 30 passages (174 jours).

Avec du tissu pulmonaire embryonnaire, HECKE réalise 15 passages (76 jours) et 19 passages (100 jours).

L'évolution de la culture du virus doit être examinée au cours d'une culture permanente dite (sans repiquage) et de la série des passages.

Au cours de chaque culture, le virus se multiplie 65 fois en 24 heures. La croissance maximum paraît obtenue après le 3ème jour, puis diminue jusqu'au 5ème ou 6ème jour. L'accroissement est mesuré par titrage sur cobayes. En fin de culture le titre baisse, il se relève après la transplantation des cultures. Le pH tombe de 7,5 à 6,9. La présence du virus est plus facilement décelée par l'inoculation du broyage des cultures que par celle de fragmentations grossières [illegible]. La concentration du virus n'est pas parallèle à la croissance du tissu, la teneur maximum en virus diminue souvent avant le degré maximum de croissance tissulaire.

Le virus persiste 5 à 6 jours sans repiquage. Si un même fragment de tissu cultivé est repiqué tous les 3 à 5 jours, avec ses cellules et son virus, sans [illegible] jours à 37°. Par broyage du tissu de culture, puis ensemencements en tissus neufs, la persistance du virus est considérablement augmentée.

La multiplication du virus, au cours d'une série de passages, présente une marche typique. Elle affecte souvent la forme d'une courbe à plusieurs sommets, comme le montre le graphique suivant d'une expérience maintenue 81 jours.

HaJKE repique tous les 2 à 6, et même 9 jours.

Au cours de l'évolution de la culture, le virus se multiplie puisqu'en cas contraire, par le jeu des passages, le virus, à la 17ème culture, aurait un titre de 1.10^{-18} et cependant serait encore virulent. Dans la série de culture de 48 jours, la dilution du virus d'origine, au 12ème passage, atteindrait $6,8.10^{-20}$.

Le titre du virus est très variable suivant les passages. Très souvent, au début d'une série de cultures, les premiers passages sont moins virulents, le titre diminue et, parfois, le virus ne peut être décelé par inoculation au cobaye, pendant 1 ou 2 passages, pour réapparaître ensuite. HECKE dit que le virus, dans ce cas, est "sous-virulent", il existe mais n'est pas pathogène. Nous en observons deux exemples sur la courbe publiée, au 9ème passage et au 15ème passage. Le titre subit des fluctuations, ne reste jamais égal, varie de 1.10^{-1} à 1.10^{-5} pour les premiers passages, mais peut atteindre 1.10^{-7} après de nombreux passages. L'aspect irrégulier des courbes du titre du virus de culture se retrouve dans toutes les expériences publiées par HECKE et par les autres expérimentateurs.

Au début de la culture, le virus se rencontre, uniquement, dans le tissu ; au cours des passages successifs il apparaît dans le milieu de culture, mais toujours d'un titre moins élevé que dans le tissu. Le titre est, dans une certaine mesure, proportionnel à la finesse du broyage. Ces résultats prouvent la relation étroite entre le tissu et le virus. Les recherches de HECKE prouvent l'affinité élective de l'agent de la fièvre aphteuse pour les tissus vivants, d'ailleurs la mort des tissus a pour résultat immédiat la disparition du virus. Autre argument expérimental : le virus en culture est protégé, par la cellule, contre le sérum immun. HECKE a également montré que l'accroissement du tissu n'est pas nécessaire à la multiplication, seule la vitalité cellulaire est indispensable. Nous verrons qu'il est ainsi en accord avec les résultats obtenus avec la méthode de MAITLAND.

Avant de réussir la culture du virus aphteux sur tissus de cobaye, par leur propre méthode, H. & M. MAITLAND avaient essayé la méthode classique de CARREL sur tissus d'embryon de poulet. Ils ont échoué car, pensent-ils, les tissus et le sang de poulet ne sont pas aptes à la culture du virus aphteux et auraient même un pouvoir virulicide sur ce virus. Le poulet n'est d'ailleurs pas réceptif à la fièvre aphteuse. De plus leurs cultures contenaient surtout des fibroblastes, cellules considérées par eux comme impropres à la culture du virus aphteux.

Pour 1 cc. d'embryon haché de poulet de 7 jours, sont ajoutés 1 cc. de solution de Tyrode et 1 cc. de virus (liquide d'aphtes de cobaye au 1/50, dilué en solution phosphates M/50, pH 7,6. Infec-

tant à 3.10-6) ; le mélange reste à +5° C pendant 2 h 30. La mise en culture se fait en flacons de Carrel, à raison de 2 cc. par flacon du mélange suivant :
2 cc. de solution virulente
12 cc. de liquide de Tyrode
6 cc. de plasma de poule frais, hépariné.
Le virus est donc dilué, finalement, à 1/1.500 dans les cultures. A 37°, le liquide qui s'est formé au-dessus du caillot est remplacé, deux fois à 48 h. d'intervalle, par une quantité égale d'une solution à 5 p. 100 d'extrait embryonnaire en liquide de Tyrode.

Le tissu pousse bien dans tous les flacons. Quant au virus, sa croissance n'est pas régulière : 35 flacons sont titrés séparément, après des incubations de [illegible] jours ; le contenu de chaque flacon de Carrel est broyé, centrifugé, et le liquide surnageant titré par inoculations intradermiques dans le coussinet plantaire de cobaye.

Après 2h. d'incubation à 37°, le virus est infectant, mais non après 24 h., et sans réapparition d'activité au 6ème jour. Le contenu, non dilué, d'un seul flacon est virulent le 5ème jour, mais, au 1/10, il n'est plus infectant. Le pH n'est pas responsable puisqu'il n'a pas varié en 24 h. Ces résultats négatifs sont confirmés par de nouvelles expériences, même après un contact virus-tissu prolongé 24 h. à 37°, ou l'addition au milieu de 1/40 d'une solution de Trypsine.

En 1932, BORREL est amené à sa technique de culture pour mettre en évidence le virus aphteux dans les cellules, par [illegible]. Il a cherché à voir l'aspect cytologique des cellules infectées, mais il ne nous a donné que peu de renseignements sur la culture du virus, sa virulence ou ses passages.

Des lambeaux épidermiques d'embryon de 3 semaines : peau, coussinets plantaires, de cobaye sont broyés finement, ou hachés, en présence d'une goutte de virus aphteux (lymphe d'aphtes de cobaye), puis lavés soigneusement au liquide de Tyrode et portés dans une solution de suc embryonnaire (embryon (8 jours) de cobaye) diluée au 1/20.

Pour l'ensemencement, il verse dans le flacon de culture, [illegible] de suc embryonnaire contenant de

30 à 40 fragments de tissus. Il ajoute 1 à 10 gouttes de plasma. Pendant la coagulation, quelques fragments entrent en contact avec le verre et, dans ce cas, la culture des cellules adhère au verre. BOREL observe un nombre considérable de granulations que nous avons signalées au cours de l'étude de la morphologie du virus aphteux.

L'intérêt des travaux de KÖBE & FERTIG (1936) tient à ce que les auteurs cultivent le virus aphteux sur des souches cellulaires pures. Ils emploient la méthode de Carrel en goutte pendante puis en flacons de Carrel ou fioles d'Erlenmeyer. Ils cherchent à déterminer sur quelles cellules de la peau ou du poumon le virus prolifère. Les lésions anatomo-pathologiques indiquent la réceptivité des cellules épithéliales, mais la fièvre aphteuse n'est pas une épithéliose pure. Il existe des lésions dans les muscles cardiaque et autres, d'où l'affinité possible *in vitro* du virus pour ces tissus. L'essai de la culture du virus dans des cultures pures de cellules épithéliales ou de fibroblastes est important, tant au point de vue théorique — étude du métabolisme du virus aphteux —, que pratique — amélioration de la culture en masse par connaissance de la cellule la plus adéquate —.

KÖBE & FERTIG incluent, au minimum, 3 fragments de tissus par goutte. Ils font 6 séries d'expériences comprenant chacune 3 cultures différentes :

- culture de fibroblastes pures ou avec un peu d'épithélium,
- culture de peau fraîche d'embryon de cobaye, selon la technique de HECKE (plasma infectieux + extrait + tissu),
- culture témoin sans tissu contenant seulement du plasma infectieux et de l'extrait embryonnaire.

Le plasma virulent d'inoculation est actif à la dilution de 1/10 ou 1/100. Après 48 h. à 37° C., le virus ne peut être décelé ni dans les cultures témoins, ni dans les cultures pures de fibroblastes avec bonne ou mauvaise croissance des cellules. Dans les cultures de fibroblastes avec un peu d'épithélium, le virus est décelé, mais avec un titre abaissé. Au contraire, dans toutes les cultures avec peau fraîche, le virus persiste et se multiplie, le titre, de 1/10 atteint 1/40 et de 1/50 atteint 1/5.000 et même 1/4.000. Les résultats sont nets, ils confirment ceux des travaux antérieurs, la multiplication du virus est en rapport étroit avec la présence d'épithélium.

Les auteurs relèvent, dans les cultures infectées de virus, la production, en 48 h., d'une croissance de fibroblastes, mais aucune croissance d'épithélium (du tissu [illegible] et du tissu sous-cutané).

Pour confirmer leur résultat, ils cultivent le virus aphteux sur [illegible] s'adressent aux cellules épithéliales de l'iris d'embryon de cobaye, cultivées avec extrait embryonnaire. Ils obtiennent des cultures de virus repiquables par passages successifs (15 passages). Ces cultures épithéliales pures sont meilleures que celles de peau entière. Toutefois le virus attaque les cellules et s'adapte ; il peut, par la suite, être cultivé sur de la peau. Sous l'influence de la multiplication du virus, une partie des cellules épithéliales se désagrège, celles qui persistent ne sont plus repiquables : c'est le cas pour les cellules épithéliales de l'iris. De ce fait, il est difficile aux auteurs de déterminer si le virus est un parasite intra-cellulaire, puisqu'il se multiplie dans des cellules détruites, ou tout au moins dont la croissance est troublée.

La culture des cellules épithéliales de l'iris est facile, mais il est difficile d'en obtenir une grande quantité. Quoiqu'il en soit, l'utilisation de cultures pures d'épithélium est favorable aux cultures du virus aphteux.

Culture sur tissus de bovins :

FRENKEL & VAN WAVEREN sont les premiers à cultiver le virus aphteux sur tissu d'embryon bovin, [illegible] ils utilisent la méthode de M. & H. MAITLAND ; nous y reviendrons.

[illegible] avons [illegible] dans [illegible], les travaux de BRAGA puis de PARRA-ZUOLAGA relatifs à [illegible] méthodes dérivées de celles de CARREL.

Signalons que FRENKEL & VAN WAVEREN n'ont pas utilisé cette méthode car leurs travaux antérieurs leur [illegible] montré que l'addition [illegible] extraits embryonnaires, autrement dit la culture du virus aphteux sur cellules en voie de multiplication, n'amène pas un progrès appréciable.

[illegible] (1951) décrit un [illegible] de culture [illegible] virus aphteux dérivé des méthodes de HECKE et de FRENKEL. Il cultive des virus adaptés au cobaye [illegible] extraits embryonnaires de cobaye et [illegible] d'origine bovine dans des milieux bovins :

Il imprègne les fragments de tissus (peau d'embryon de cobaye ou de bovin, selon l'origine du virus) par un contact de 10 minutes environ avec le virus aphteux dilué en solution tamponnée phosphatée. Dans un flacon de Carrel il met 0,5 cc. de plasma de bovin, ou de cobaye, prélevé à la jugulaire (bovin), ou au coeur (cobaye), et hépariné à 1 p. 10.000. Il ajoute 0,6 cc. d'extrait embryonnaire de bovin (cerveau et muscles d'embryon), ou de cobaye (embryon entier prélevé par laparotomie aseptique), préparé le jour de la mise en culture et dilué à 30 p. 100 en solution de Tyrode. Les fragments de tissus sont répartis dans le flacon. Il ensemence avec 1 cc. de virus (lymphe de vésicules aphteuses de bovin ou de cobaye exempte de cellules et de germes) dilué à 10 p. 100 en solution phosphatée. Il complète par 1 cc. de solution à 10 p. 100 de plasma de bovin, ou de cobaye, en liquide de Tyrode. La coagulation s'effectue rapidement. Les flacons sont déposés, 3 à 4 jours, à l'étuve à 38° C.

Nous avons peu de renseignements sur les résultats des essais de BRAGA. Il obtient, après 48 h. de culture, un virus C bovin virulent : l'inoculation de 2 gr. du broyage de la culture reproduit, chez un veau de 4 mois, les symptômes classiques de la fièvre aphteuse, 40°2 et apparition d'aphtes.

Après lavage au Tyrode, les cellules d'embryon de cobaye préalablement immunisé contre le virus aphteux, type C, permettent encore la culture. Ce virus donne la même infection, au cobaye adulte, que le virus de culture obtenu sur tissus normaux.

Récemment, en 1947, ARAN-ZUOLAGA a publié ses résultats de cultures du virus aphteux sur les tissus foetaux d'origine bovine.

Il emploie, pour la culture du virus aphteux, la méthode classique, en goutte pendante ou en flacons d'Erlenmeyer, avec extrait embryonnaire ; il suit la technique de BRAGA avec quelques préparations particulières dont nous décrivons les principales.

La comparaison des plasmas de poulet, de cobaye et de bovin a déterminé l'expérimentateur à utiliser celui de bovin, en raison de son abondance, son obtention facile en grande quantité, sa résistance à la fibrinolyse, sa stabilité, sa rapidité de coagulation au contact de la tréphone et, surtout, d'être homologue au tissu cultivé. Le sang est recueilli, suivant le mode classique, en présence d'héparine, dans des tubes refroidis.

Les tréphones proviennent de muscles et de cerveaux de foetus de bovin. Les muscles sont prélevés dans la région du dos, des cuisses, du cou et de la tête. Les tissus sont lavés dans une solution isotonique de Ringer pour éliminer le sang. Ils sont broyés

en présence de solution de Ringer (3 parties de Ringer pour 1 de tissu). La pulpe obtenue est centrifugée à 5.000 tours pendant 20 minutes. Le liquide surnageant, non hémolytique, a un aspect clair. Cet extrait embryonnaire est utilisé dans la proportion de 20 p. 100. Des examens bactériologiques prouvent sa stérilité.

Après différents essais de culture à partir de coeur d'embryon de poulet, de peau, poumon, langue, oesophage, rein, rate et foie, testicule de foetus bovin, PALMA-ZULOAGA fixe son choix sur la peau de foetus de bovin de 3 mois environ ; le foetus doit avoir 15 cm. de long de la pointe de l'occipital au coccyx. L'auteur a précisé, par des coupes histologiques de la peau, la zone épithéliale intéressante pour les cultures : c'est la couche de cellules cubiques qui s'appuient sur la membrane basale. En culture, ces cellules épithéliales maintiennent leurs caractères au cours des premiers passages, puis elles se dédifférencient, deviennent du type fibroblastique et forment des cordons émigrant tout autour du fragment de peau d'ensemencement.

Les virus sont de souches argentines des 3 types O, A, C, ayant subi de nombreux passages sur bovins. [illegible] d'aphtes est [illegible] dans le sérum physiologique à 8,5 p. 1.000. Cette suspension est filtrée sur bougie Berkefeld ou, mieux, sur amiante Seitz E.K. Le filtrat est éprouvé bactériologiquement. Pour les premières cultures, les souches d'origine ont été employées, par la suite, les aphtes provenaient de bovins inoculés de virus de culture afin de chercher à avoir une souche bien adaptée.

Pour la mise en culture, la peau est découpée, au couteau, en petits morceaux de 2 mm² environ, en évitant de traumatiser les tissus. Ces fragments sont lavés, dans une boîte de Pétri, avec 15 cc. de solution de Ringer, pour les débarrasser de toute trace de sang. Les tissus sont imprégnés de virus par contact de 10 ou 60 minutes, et même 24 heures. Il est conseillé d'éviter une exposition prolongée à la lumière.

La mise en culture commence en introduisant le plasma dans le flacon d'Erlenmeyer, de manière que le fond en soit recouvert, puis l'extrait embryonnaire en solution de Ringer ; on mélange par agitation, rapidement, avant la coagulation, quelques fragments

de tissus imprégnés de virus sont placés, côte à côte, dans ce [illegible] des quantités [illegible] fonction du volume des récipients. Après la coagulation qui s'opère en 2 ou 3 minutes, PALMA-ZULOAGA ajoute du plasma à 10 p. 100 en liquide de Ringer.

Les flacons sont bouchés au coton recouvert de gaze et capuchonnés de cellophane. Ils sont placés à 37° pendant 96 h.

Le repiquage est délicat, au double point de vue de l'infection et des traumatismes. Un fragment de plasma est retiré et découpé au couteau à iridectomie ; les zones périphérique, peu riche en cellules vigoureuses, et centrale, plus ou moins autolysée, sont rejetées pour les nouveaux ensemencements. Il est conseillé de laver le fragment choisi à la solution de Ringer.

Par cette méthode PALMA-ZULOAGA (1946-1947) cultive le virus aphteux pendant 6 passages avec d'excellents résultats. La suite des passages est interrompue volontairement. Tous les virus de passages sont virulents pour les bovins de 10 à 14 mois. La maladi[e] se présente avec les mêmes caractères que celle provoquée par le virus d'origine. Le temps d'incubation est de 18 à 24 heures, sauf dans un cas : 36 heures. Les lésions provoquées par le virus de culture ne diffèrent pas de celles qui apparaissent normalement avec le virus originel. La peau des foetus de bovin de 3 mois est meilleure, pour les cultures du virus aphteux, que les autres tissus. Les extraits de muscles et de cerveaux foetaux stimulent ses cultures et les intensifient.

PALMA-ZULOAGA pense avoir la preuve d'une multiplication du virus et non une conservation de sa vitalité. A 37°, pendant 4 jours, une dilution de virus aphteux perd son activité ; ce fait est bien connu, il en apporte une nouvelle preuve :

Il divise, en trois lots d'égal volume, une dilution connue de virus aphteux ; le premier sert à inoculer une culture, le deuxième est placé à 4° et le troisième à 37°. Au bout de 4 jours, les trois lots sont inoculés à des bovins ; seule la dilution placée à 37° est avirulente. Au bout de 96 h. à 37° le virus est détruit.

Dans ces conditions, s'il n'y a pas multiplication du virus, [illegible] 37°, or, par le jeu des repiquages successifs, PALMA-ZULOAGA a conservé, vivant, un virus exposé 480 heures à 37°.

Le virus a un maximum de croissance entre la 76ème et la 100ème heure de culture. Le titre du virus cultivé atteint 1 p. 10.000. Le séjour à la chambre froide, pendant 4.864 heures, n'affecte pas la virulence des cultures. Les cultures gardent leur vitalité et leur pouvoir de reproduction si elles sont conservées

9 jours à [illegible] dans un liquide conservateur composé d'eau glycérinée [illegible] (cités de [illegible]ROZA & RUTTGARDT 1927).

Les trois types de virus ont fait l'objet de culture, les résultats sont constants avec les types O et C, mais irréguliers avec la souche A.

Ce virus de culture permet la préparation d'un vaccin trivalent concentré selon la méthode de VALLÉE-SCHMIDT-WALDMANN. Les premiers résultats sont encourageants, aussi bien au laboratoire que sur le terrain. [illegible] poursuit ses recherches en vue d'adapter sa technique à l'augmentation de la production du virus. Il tient aussi à confirmer le taux de multiplication et à préciser le titre et les propriétés antigéniques des virus de culture.

Méthode simplifiée de M. & H. MAITLAND et méthodes dérivées

Cultures sur tissus de cobayes :

M. & H. MAITLAND (1931) (1) ont réussi la culture du virus aphteux par leur méthode simplifiée sur cultures de tissus d'embryon de cobaye sans nouvel apport d'extrait embryonnaire. Ce travail a été fait en même temps, mais indépendamment de celui de HECKE.

Technique :

Cette méthode a l'avantage sur celle de CARREL, d'être plus simple tout en donnant une plus grande quantité de virus.

Le virus d'inoculation des cultures est la souche "G.P." de type C Vallée, adaptée au cobaye. La lymphe, recueillie sur des aphtes de cobaye, est diluée au 1/50 dans un tampon phosphaté M/50 de pH 7,6 et filtrée. La solution témoin est titrée sur cobaye par inoculation d'une série de dilutions, dans le coussinet plantaire.

[illegible] fourni par les coussinets plantaires [illegible] langue d'embryon de cobaye [illegible] quelques cultures ultérieures [illegible] elue sont ajoutés. Du tissu [illegible] avec une grosse pipette.

(1) [illegible]

est mis au contact [illegible] virus [illegible] de la solution filtrée), 1 h 30 à [illegible]

Après ce temps, [illegible] cc. de plasma de cobaye, frais et hépariné, et une quantité [illegible] de Tyrode sont ajoutés pour faire un volume total de [illegible]. Les flacons de Carrel reçoivent [illegible] cc. de ce mélange final et sont incubés à 37°. Chaque flacon contient 0,065 de tissu, 0,135 de solution virulente, 0,6 de plasma et 1,2 cc. de liquide de Tyrode.

Au cours des neuf premiers passages, un ou plusieurs flacons sont titrés après incubation de 1, 5 ou 6 jours ; à partir du 9ème passage, après incubation de 3 ou 4 jours. Pour titrer le virus de culture, le contenu d'un flacon est broyé avec du sable, centrifugé, et le liquide surnageant titré comme la suspension virulente témoin.

Les repiquages sont faits à partir de ce liquide surnageant, dilué au 1/10 ou au 1/15 dans un tampon phosphaté M/50, pH 7,6, filtré et conservé à 5° C.

[illegible] ont réalisé [illegible] essais de culture "en masse". Ils emploient des flacons de [illegible] contenant 50 cc. de milieu. Le virus se développe bien et le titre, après 4 jours d'incubation est de 1 p. 1.000.

Résultats :

Le virus aphteux se multiplie au cours de 17 passages successifs pendant une durée totale de [illegible] mois. La comparaison des titres du virus dans les cultures de passage avec le titre du virus utilisé pour la mise en culture est la preuve de la culture du virus. 25 séries de cultures ont été faites, certaines en double. Le virus de culture a un titre maximum supérieur au virus témoin d'origine dans 21 séries de cultures ; il est de titre égal dans une, inférieur dans [illegible]. Le titre maximum atteint souvent 1.10^{-4} et, parfois, 1.10^{-5}. [illegible] sont faibles : de 1.10^{-1}, 6.10^{-1}, [illegible] de la dilution et de la conservation ne sont pas acceptées.

La multiplication du virus est [illegible]. Dans [illegible] séries il y a une multiplication [illegible] ; dans 7 : 1.000 [illegible] et l'on considère [illegible] du virus d'origine, il est toujours infectant ([illegible]) après 17 passages, ce qui représente une dilution de 4 [illegible] et la conservation en culture ou à la [illegible].

Le virus de culture peut être repiqué après une conservation de 3 mois à + 5° C.

[illegible]

1/4 est suffisant. Pendant la culture les qualités [illegible] pathogènes du virus ne sont pas altérées, les [illegible] primaires sont étendus et les lésions de gén[illegible] se succèdent régulièrement. De même, les qualités immunisantes sont conservées : 4 cobayes guéris d'une infection avec du virus de culture au 8ème passage résistent, un mois après, à une inoculation sévère de virus.

L'uniformité des résultats est un autre critère de la culture :

Chaque série représente 6 à 20 flacons et [illegible] séries positives sur 25 ; les résultats doi[illegible] considérés comme uniformes ; les plus hauts titres [illegible] ordinairement obtenus le 3ème ou le 4ème jour d'incubation, [illegible] dilution active maximum est également constante pour [illegible] 21 séries : 1.10^{-3} pour 6 séries, 1.10^{-4} pour 12 et 1.10^{-5} pour 3.
Il y a quelques résultats plus nuancés. Le titre des meilleures cultures est inférieur à celui de la lymphe d'aohtes de cobayes, infectant souvent aux dilutions de 1.10^{-5} à 5.10^{-6}.
Le titrage de chaque flacon d'une même série montre qu[illegible] [illegible] rus n'est pas toujours 3 ou 4 jours.
Aussi pour rendre les résultats plus uniformes et avoir un test plus exact [illegible] & H. [illegible] titrent le virus sur le mélange de plusieurs flacons au 4ème jour d'incubation. Les résultats sont plus constants et peuvent être mieux comparés dans les séries de cultures et les [illegible]ences.

[illegible] affectant [illegible] croissance du virus dans les cultures de tissus [illegible] de cobayes

[illegible] recherches sont faites en modifiant les cult[illegible] leur technique ou dans leur composition et en [illegible] leurs résultats avec ceux de cultures témoins. [illegible] & H. [illegible] espèrent ainsi améliorer ou simplifier [illegible]

Relation entre la croissance du [illegible] et [illegible]

[illegible] 1931), [illegible] des tissus [illegible] virus, [illegible] 1 à 2 [illegible] temps [illegible] [illegible] (pour stimuler la croissance). Les cel[illegible] sont souvent des fibroblastes, quelquefois des c[illegible] liales.

Changement du tissu :

Les tissus : coussinets plantaires, lèvres et langues sont sélectionnés pour les premières cultures puisqu'ils sont les li[eux] de prédilection du virus. Des expériences précédentes effectuées *in vivo* chez le cobaye par M. MAITLAND (1928) avaient montré que [la peau] velue était susceptible de développer des lésions aphteuses, si elle était soumise à des pressions intermittentes. Les résultats de 2 séries de cultures de virus sur peau velue et ceux de cultures sur tissus classiques sont identiques.

Bien que les cobayes infectés de fièvre aphteuse ne présentent aucune lésion rénale, M. & H. MAITLAND ont fait des cultures de virus sur rein de cobaye [illegible]. La culture sur rein embryonnaire est positive alors qu'elle est négative sur rein adulte.

Un milieu simple composé de rein adulte haché, de sérum et de solution de Tyrode, favorise l'accroissement du virus vaccinal (M. & H. MAITLAND, 1928) [illegible] virus [illegible] à l'incubateur, et filtré 2 fois, est infectant mais incapable de proliférer en cultures ultérieures. La présence de virus dans la 3ème culture doit être dûe à la persistance du virus originel du 1er ensemencement, plutôt qu'à une multiplication réelle.

Le remplacement du rein par un broyage d'embryon de cobaye, ou l'augmentation de la proportion de rein, de sérum, ou l'addition de trypsine, n'est pas suivi de meilleurs résultats. Le foie adulte diminue le temps de la survie.

Modification de la composition du milieu :

Glucose : La multiplication du virus de culture, en présence de 0,5 à 1 p. 100 de glucose est comparée à celle du virus de cultures témoins. Le glucose hâte le temps d'accroissement maximum du virus, [illegible] celle des contrôles. Le virus [illegible] plus rapidement : après 1 jour d'incubation le titre de culture varie de 1.10[illegible] à 1.10[illegible] alors que les témoins sans glucose sont [illegible] à 1.10[illegible]

[illegible] p. 100 de Trypsine accélère le taux de développement du virus mais, contrairement au Glucose, ne provoque pas sa mort aussi rapidement.

Protéose : D'après WILLMER, la peptone de Witte stimule la croissance des embryons de poulets.
M. & H. MAITLAND en ajoutent 1 p. 100 à leurs cultures. Le titrage du virus après [illegible] à 6 jours d'incubation prouve que : dans 8 flacons avec protéose le virus est [illegible], dans 7 le virus est égal, et dans 3 il est inférieur.
La peptone peut accroître la production de virus mais ne semble pas en rapport avec une augmentation de croissance [illegible].

[illegible] carbonique ou d'azote :
Ces gaz n'influent pas sur la culture du virus.

Les résultats très encourageants obtenus par M. & H. MAITLAND ont incité d'autres expérimentateurs à renouveler et améliorer la culture du virus aphteux par [illegible].

Tout d'abord HECKE, bien que pensant au rôle néfaste des conditions d'équilibre instable des cultures en masse de ce genre, a produit, en 1933, d'assez grandes quantités de virus aphteux par une technique semblable, dans ses grandes lignes, à celle décrite par H. & M. MAITLAND.

Le [illegible] des cultures broyées, filtrées sur Seitz, se conserve assez longtemps à la glacière (178 jours [illegible]).

[illegible] virus semblent se modi- [illegible] pathogène d'un virus C [illegible] son pouvoir immuni- [illegible] C en passage depuis [illegible] surtout au cours des der- [illegible] de 1.10^{-6} à 1.10^{-7}.
[illegible] obtenu par broyage des cul- [illegible] filtres Seitz E K. L'addition, aux broyages, d'une petite quantité de sérum normal a pour effet de rendre les filtrats infectants.

[illegible] continuant les travaux de HECKE, [illegible] culture de M. & H. MAITLAND, en [illegible] en présence de cellules vi- [illegible] solution de Tyrode). Il a fait, [illegible] embryonnaire de cobaye

dans du sérum de cobaye en solution de Drew [illegible], dans la solution de Drew pure ; les auteurs anglais avaient obtenu 3 passages sans suite ultérieure, l'auteur [illegible] des cultures positives avec ou sans sérum. En général la quantité de virus diminue petit à petit dans de telles cultures, et au fur et à mesure des passages.

Il part de virus type O : lymphe de cobaye au 1/20 en solution phosphatée tamponnée à pH 7,6 et filtrée sur Seitz E K.
Le tissu est de la peau d'embryon de cobaye de 7 à 10 gr. coupée finement, lavée en solution de Drew. Les fragments sont [illegible] à 1,4 cc. de filtrat de lymphe et laissés en contact 5 heures à + 5° C.
Le sérum préparé par saignée du Cobaye, à la carotide et dilué au 1/3 en solution de Drew, est filtré sur Seitz E K.
Le tissu (7 à 15 gr.) est en suspension dans 18 cc. de solution de sérum. 2,2 cc. du mélange sont mis à incuber dans des flacons d'Erlenmeyer. Les cultures sont mises 4 jours à 37°, puis repiquées par broyage de la culture en présence de solution tamponnée phosphatée à pH 7,6.
Le virus se multiplie bien et atteint des titres de 1.10^{-4}, quelquefois 1.10^{-5}, et même 1.10^{-6}.
Par cette méthode, STRIEGLER réussit autant de passages qu'il le désire : 22 passages pendant [illegible] jours, la dilution du virus d'origine est alors de 1.10^{-22} ; son record est l'entretien d'une culture à travers 118 passages en [illegible]. Au 64ème passage, le [illegible] jour, le virus d'ensemencement était déjà dilué à 1.10^{-114} ; il y a donc eu une multiplication certaine du virus.

La culture du virus réussit aussi bien dans la solution de Drew avec sérum que dans la solution de Drew seule. Toutefois, dans cette dernière, les cultures, après filtration sur Seitz E K, sont dépourvues de virus (1). Il est nécessaire, comme HECKE le préconise, d'ajouter 1 p. 100 de sérum avant la filtration pour ne pas avoir de perte appréciable de virus. La filtration sur bougie Berkefeld V n'entraîne qu'une faible diminution d'activité du virus. Les filtrats de cultures sur Seitz, avec addition de sérum, sont encore infectieux après une conservation de [illegible] à la glacière ; en solution de Drew la conservation n'atteint que 3 semaines.

STRIEGLER (1934) apporte des précisions sur ses cultures avec ou sans sérum. Il est important d'utiliser une lymphe aphteuse de cobaye conservée depuis moins de 24 heures comme point de départ d'une série prolongée de cultures dans la solution de Drew sans plasma,

---

(1) Les travaux au microscope électronique faits par GIRARD et ses collaborateurs, confirmés par les nôtres, laissent à p[illegible] dans un liquide non tamponné à pH 7,6, le virus s'agglutine en ses particules et reste [illegible] filtre Seitz E K 1. Le sérum disperse-t-il les corpuscules aphteux

ni sérum. Les premières cultures (3 passages -type O- ou 1[illegible] passages -type [illegible]-) doivent se faire selon la méthode de M. & H. [illegible] et peuvent être ensuite poursuivies dans la solution de Drew seule. Le virus aphteux devient, par conséquent, moins exigeant au cours de la culture. Il s'adapte au milieu puisque le titre du virus augmente au fur et à mesure des passages dans la solution de Drew.

La culture, en milieu liquide, avec lymphe de Cobaye comme point de départ réussit régulièrement s'il est ajouté du sérum de Cobaye. Le même résultat est obtenu avec : le sérum normal frais ou inactivé, le sérum stérile conservé 3 semaines à l'abri de la lumière, à la température de la chambre ou à la glacière, a le même pouvoir.

Au contraire, l'addition de sérum contenant un taux élevé de graisses entraîne la disparition du virus au cours d'un seul passage ; de même le sérum immunisant de Cobaye a [illegible] virulicide puisque le virus est tué au cours de 2 passages.

Un sérum hétérologue : le sérum frais et stérile de Bovin permet la culture, STRIEGLER a poursuivi ainsi 9 passages, mais l'infectuosité des cultures est, en moyenne, 10 fois plus faible que celle des séries témoins préparées avec le sérum de Cobaye.

Ainsi, en cultures en présence de cellules vivantes, le virus se montre sérophile. Au cours des cultures successives il s'adapte et se modifie à un tel point qu'il cultive en solution pure de Drew, en présence de cel- [illegible]

STRIEGLER a réalisé des cultures en assez grande quantité, puisqu'il a préparé, régulièrement, 1.500 à 2.000 cc. de liquide de culture par semaine. Ce virus a servi à la production de sérums immuns.

L'écueil le plus important, au cours des cultures, est l'irrégularité de la virulence du virus qui passe d'un titre de 1.10^{-6} à 1.10^{-2}, en 5 passages pour remonter à $1.10^{-?}$ dans les 5 passages suivants.

STRIEGLER & NAGEL (1955) poursuivent la comparaison [illegible] types [illegible], [illegible], [illegible] de virus aphteux [illegible] à base de plasma, de sérum ou de solution [illegible] générale est celle de [illegible] cultures des 3 types sont entre- [illegible] dant 5[illegible]

Le titre du virus (1.10^{-6} au départ) diminue dans tous les milieux. Le résultat est valable pour les 3 types. Les cultures en plasma et sérum sont les plus favorables à la multiplication du virus. Pour le type O, le titre du virus des cultures en plasma est, au 11ème passage, de 1/3.000, en sérum de 1/25.000 et, en solution de Locke, de 1/700 ; pour le type C, en plasma : 1/76.000, en sérum : 1/37.000 et en solution de Locke : 1/12.000.

Selon les types, le titre des cultures, la virulence (mesurée par le rapport entre le pourcentage de cobayes à lésions primaires et celui de cobayes à lésions secondaires) et l'infectuosité (titre) varient et pas toujours dans le même sens.

En culture de longue durée, par exemple au 21ème passage, le virus de type C a une virulence assez grande et une infectuosité plus faible, contrairement à un virus de type O chez lequel une virulence plus faible est associée à une infectuosité plus élevée. En effet, pour la virulence du type O, le rapport lésions locales/généralisation est de 1,79/36,54, alors que pour le type C il est de 12,73/94,90. Inversement, le titre du virus O est, selon les milieux de cultures de 1/700 à 1/25.000 et, pour le virus C de 1/12.000 à 1/76.000.

L'infectuosité peut ne pas diminuer au cours de culture de longue durée, mais elle diminue par une conservation des filtrats de virus pendant plus de 12 semaines à 0° C.

Les cobayes ayant fait une fièvre aphteuse généralisée après une inoculation de virus de culture ou même ayant seulement eu une atteinte localisée sont immunisés contre le même type de virus.

Après une infection générale par O, A ou C, respectivement 31,1, 93,5 et 82 p. 100 des cobayes sont immuns ; après une infection locale le pourcentage est de 41, 63,6 et 46 p. 100.

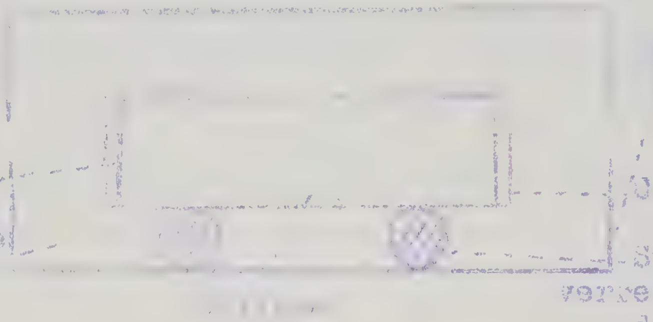
Au cours des cultures la pureté des titres se maintient.

Ces résultats, obtenus avec une méthode simple, laissent espérer beaucoup de la méthode de H. & H. MAITLAND. Une amélioration de la préparation du virus ainsi cultivé est souhaitable car, nous l'avons vu, la virulence baisse régulièrement au cours de toutes les séries de cultures.

C'est dans ce but que BORCILA (1936) a imaginé la culture du virus aphteux en cultures de tissus sur membranes de cellophane.

[illegible] produits de déchets et les substances inhibitrices nuisibles [illegible] pouvant ainsi s'éliminer à travers une membrane [illegible] de meilleures conditions de [illegible]

Le dessous d'une boîte de Pétri est percé d'un trou qui sert à introduire la culture. Cette demi-boîte de Pétri est recouverte, sauf le trou d'introduction, d'une feuille de cellophane, elle est alors posée sur un support en verre, en forme de V, contenu dans le couvercle renversé d'une boîte de Pétri ; un 2ème couvercle, de mêmes dimensions, ferme l'ensemble.



BORCILA suit, en partie, la technique de M. & H. MAITLAND : 0,5 cc. de peau et de poumon de foetus de cobayes sont coupés finement sur une lame à concavité ; ce tissu est mélangé, dans un petit Erlenmeyer, à 1,5 cc. de virus aphteux de culture, dilué à proportion égale dans du liquide de Tyrode. Après une conservation de 2 à 4 h. à + 2°, le mélange tissus-virus est suspendu dans 15 cc. de solution de Tyrode, pH 7,6. La moitié du mélange est introduite sur la membrane de cellophane par l'ouverture du couvercle renversé de la boite de Pétri, l'autre moitié est placée dans un flacon d'Erlenmeyer en vue d'une culture qui sert de contrôle. On ajoute, aux deux cultures : 1 cc. de plasma hépariné de cobaye (1 cc. de solution héparinée à 1/500 pour 10 cc. de sang) ; les cultures coagulent et on verse [illegible] de solution de Tyrode (20 à [illegible]) dans le fond de la boîte de Pétri extérieure pour que la membrane de cellophane baigne. Les deux couvercles sont collés par une bande de toile gommée stérile et le tout est enveloppé par un même papier. [illegible] contamination de la tuberculose ne peut pas intervenir pendant une incubation de quelques heures.

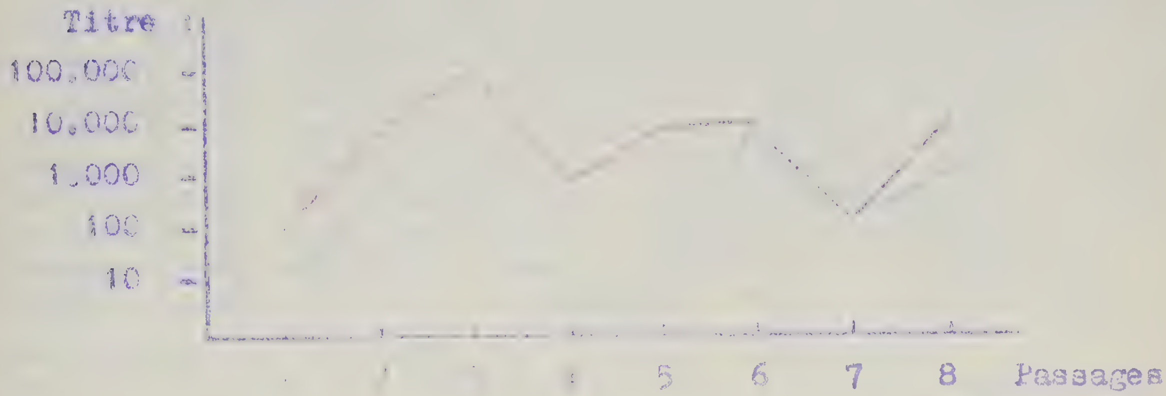
Les cultures sur membrane et dans flacon (témoin) sont placées à l'étuve à 37°. Elles y sont laissées [illegible] selon les séries.

Après [illegible] et vérification de leur stérilité les cultures retenues par la membrane de cellophane sont broyées, par série, dans un mortier avec du sable

et centrifugées 15 minutes à 3.500 tours. Le liquide surnageant est titré sur cobayes et son pH est mesuré, il sert à l'ensemencement des passages suivants. Dans ce cas 10 cc. sont dilués dans 8 cc. de tampon phosphaté pH 7,6 et 2 cc. de sérum normal de cobaye, le mélange est filtré sur Seitz E K. Le liquide de Tyrode placé sous la membrane est également étudié au point de vue stérilité, pH et infectuosité.

Les cultures témoins sont examinées et repiquées dans les mêmes conditions.

Les résultats de BORCILA confirment son hypothèse : la teneur en virus des cultures sur cellophane est 10 à 100 fois plus forte que celle des cultures [illegible] sur plasma. Voici l'une des courbes publiées par BORCILA :



Le titre atteint [illegible] dans 45 p. 100 des cas, le liquide sous-jacent se montre [illegible]. 72 passages sont réalisés.

Après 40 [illegible] le pH des cultures sur membranes tombe de 7,40 à [illegible] est [illegible] élevé que celui des cultures témoins passant de [illegible] Le pH du liquide sous-jacent à la membrane est toujours inférieur à celui de la culture placée sur la membrane ; les produits de désintégration de l'albumine diffusent dans ce liquide.

Le moment de multiplication maximum du virus aphteux sur membrane est situé entre [illegible] et 50 h. à 37° C. et, pour les cultures témoins, entre [illegible]. Après 60 à 80 h. de cultures sur membrane ou en flacons [illegible] ne peut plus être mis en évidence.

Au cours d'un séjour [illegible] à l'île de Riems, TOUSSIENG ([illegible]) réalise des essais de culture de différentes souches de virus aphteux. Il [illegible] une souche O provenant du Cobaye, par des passages [illegible] de foetus de cobayes. Il obtient

une multiplication [illegible] du virus mais le titre reste bas. Il ne remarque pas une affinité spéciale de la souche utilisée pour le tissu cérébral, ni dans les cultures de tissue, ni chez les cobayes par inoculation intracérébrale.

Les travaux de [illegible], [illegible], FERTIG, STRIEGLER, NAGEL & BORCILA que nous venons de voir ont été effectués à l'Île de Riems, sous la direction du Professeur WALDMANN. De [illegible] à [illegible], WALDMANN, seul ou avec [illegible], a étudié le virus de culture au point de vue de ses qualités pathogènes et immunisantes. Ces chercheurs ont, à leur disposition, de grandes quantités de virus de culture et ont réalisé des essais de vaccination sur une assez grande échelle (F. 600). Leur production de virus de culture sur tissus de Cobaye a atteint 7 à 8 litres par semaine. Leur premier essai a été conduit à partir de souches standard de virus aphteux de plus de 1.000 passages sur le Cobaye. Selon WALDMANN, il faut au moins 5 à 10 passages avant l'adaptation du virus au milieu et c'est seulement après cette période que la multiplication atteint son maximum. La culture du virus a son plein développement en 36 h., à 37°, ensuite son activité diminue rapidement.

Le virus de passage sur Cobaye et le virus de culture d'origine cobaye se comportent de même ; ils perdent une grande partie de leur virulence, de leur contagiosité pour le bovin : l'infection reste atténuée ; ils conduisent à un échec pour l'immunisation des bovins. Ils peuvent récupérer leur activité par plusieurs passages successifs sur bovins.

Cultures sur tissus de mammifères artiodactyles : ruminants et porcins.

A la suite des résultats sur tissus de cobayes il était logique de tenter la culture du virus aphteux bovin sur tissus d'animaux spontanément réceptifs : bovins, ovins, caprins, porcins.

C'est ce qu'a réalisé, avec succès, à partir de 1933, FRENKEL.

En [illegible], WALDMANN pense renoncer à cette méthode car pour lui elle n'est utilisable que lors de relations possibles avec de grands abattoirs, néanmoins il admet que "l'on doit s'attendre à une augmentation de

"La virulence du virus de culture [illegible] "vaccins". Nous retrouvons [illegible] (p.3..) [illegible] WALDMANN & KÖBE (1938), [illegible] (1939), [illegible] (1941) expérimentent avec ce virus de culture [illegible] d'origine [illegible], mais il n'est pas donné de renseignements sur le procédé de préparation du virus de culture.

Méthodes de Frenkel :

FRENKEL (1933) fait ses premières cultures de virus aphteux dans des cellules [illegible] selon la méthode de DE [illegible]

Dans l'appareil de [illegible] (19..) les cellules à cultiver sont immergées et constamment pourvues de liquide nutritif [illegible]. Les produits toxiques sont évacués au fur et à mesure. [illegible] améliore l'appareil par l'établissement d'une circulation continue du liquide nutritif et son aération. Sur ces bases, [illegible] fait construire un appareil plus ample et de contenance [illegible]. Une petite cuve de verre comprend 2 robinets à sa partie [illegible] - l'un pour [illegible], l'autre pour vider l'appareil [illegible] prélèvement pour [illegible]. Un couvercle rôdé ferme hermétiquement la cuve. Un tube, muni d'un [illegible] et d'un entonnoir, [illegible] de la cuve, permet l'introduction du liquide nutritif et l'é[illegible] au fond du vase, [illegible] lamelles sur lesquelles les cellules cultivent.

Les lamelles et la culture sont préparées selon la méthode de DE JULIUS :

Les cellules à cultiver [illegible] pin ou de Porcelet : 10 [illegible] stérile émulsionnés dans 300 cc. de solution de [illegible] injectés dans la cavité [illegible]néale du lapin. 24 h. [illegible] de solution de Ringer [illegible] introduits dans le péritoine. [illegible] de 2 h. l'exsudat [illegible] levé et réparti immédiatement [illegible] tenant, chacune, deux [illegible] line. Le liquide [illegible] placées dans l'appareil. [illegible] de 60 litres, l'[illegible]. L'appareil e[illegible]

Avec cette méthode, FRENKEL [illegible] des cultures de 30 [illegible]

[illegible] de
[illegible] du virus aphteux
sur ces cellules [illegible] sont infructueux.
Avec VAN WAVEREN, [illegible] cultures sur
fibroblastes [illegible] également. Il est
donc prouvé, [illegible], que les fibroblastes
et la [illegible] sont réfractaires à la culture du virus
aphteux.

Devant ces résultats, FRENKEL & VAN WAVEREN ont dirigé leurs efforts de culture du virus sur des cellules d'épithéliums d'espèces naturellement réceptives à la fièvre aphteuse.

FRENKEL & VAN WAVEREN (1934) simplifient la méthode de FRENKEL avec son appareil à "aération" :

Des fragments de peau de foetus de vache sont coupés aux ciseaux dans une boite de Pétri. Ils sont immergés dans une solution comprenant deux parties de Tyrode stérilisé sur bougie Chamberland [illegible] et une partie de sérum de vache ; le tout est conservé à + 2° pendant une nuit.
Pour la préparation de [illegible] en culture, quelques gouttes de virus [illegible], filtrées, sont ajoutées au mélange, remis [illegible] à la glacière.
La culture est placée, pour l'incubation, dans un appareil à "aération". La quantité de liquide est, en proportion, plus faible que celle du tissu. Dans ces conditions, le virus est tué très rapidement, en raison [illegible] de la [illegible] trop épaisse de tissus et de l'acidité qui en découle.

FRENKEL & VAN WAVEREN (1935) abandonnent la méthode d'aération pour se consacrer à la méthode de M. & H. MAITLAND. Ils obtiennent de très importants résultats.

[illegible] flacons de Carrel
et [illegible] les proportions indiquées
par [illegible]. Pour leurs premières expé-
riences, ils [illegible] peau embryonnaire bovine,
[illegible], le virus aphteux porcin
(type A) et la [illegible] Tyrode. A 37° ils réali-
sent [illegible] durée totale de 10 jours.
[illegible] du milieu est de 6,2 à
[illegible] consistance de
[illegible] rochement des
[illegible] remplacent le

plasma bovin par du plasma de poule -inoffensif pour le virus aphteux- qui donne un caillot plus solide.

Voici la technique qu'ils ont finalement adoptée

L'utérus gravide de la vache est prélevé, aux abattoirs, d'une manière strictement aseptique. Le foetus ne doit pas avoir plus de 30 cm. de la nuque à l'origine de la queue. Il est placé dans une [illegible] Celle-ci est choisie, de préférence, dans les lieux de prédilection du virus ou sur l'encolure. Elle est coupée, aux ciseaux, en morceaux de quelques millimètres carrés. Pour un peu plus d'un demi-gramme de tissus il est ajouté 1,5 cc. de virus porcin filtré et le mélange reste 1 h. 1/2 à 2 h. à la glacière, il peut même être laissé 24 h. sans inconvénient, ni pour les cellules, ni pour la faculté de multiplication du virus. La solution de Tyrode et de phosphate de soude 1/15 M. (12 cc.), puis le plasma de poule, ou de bovin, héparine (6 cc.) complètent la culture.
Chaque flacon de Carrel reçoit 2 cc. du mélange. La coagulation [illegible] Les flacons sont mis à 37° pendant 2, 3 ou 4 jours.
Pour le repiquage, le contenu des flacons est broyé au sable, di- [illegible] à ensemencer les nouvelles cultures.

Ainsi mis en culture, le virus aphteux se multiplie de façon considérable : la première culture d'une série est ensemencée avec 1/6 cc. d'un virus porcin, type A, actif à 5.10-4. Les repiquages sont faits après 3 à 5 jours d'incubation. Au 8ème passage, le virus conserve son titre. Le virus d'origine atteint une dilution de 31.10-12 après un séjour de 28 jours à 37°. La multiplication ne fait aucun doute.

FRENKEL & VAN WAVEREN ont modifié la composition et les conditions de leurs cultures.

Milieu

Solution physiologique :

La solution de Tyrode est remplacée, avec avantage, par du liquide amniotique d'origine bovine filtré sur Seitz E.K. Les [illegible] être plus longue. Un liquide contenant du sulfate de magnésium [illegible] est manifestement nuisible, les cellules se gorgent de gouttelettes graisseuses et le virus tarde à se [illegible]

Solution tampon

Le remplacement du phosphate de sodium par le carbonate de calcium est possible, mais il amène une légère [illegible] des cultures

La solution de phosphate de soude M/5 peut remplacer la solution M/15. Le pH se maintient près de 7,5 au cours de toute la culture. La production de virus est régulière. Le même résultat est atteint par insufflation [illegible] en-virons de 7,3.

Plasma :

FRENKEL & VAN WAVEREN (1955) remplacent le plasma de Poule, élément nutritif peu important, par une solution de Ringer-gélose à 1,5 p. 100. La concentration finale de la gélose dans le milieu nutritif est de 0,75 p. 100. Ils ajoutent du sérum de veau. La croissance du tissu est moins nette, mais le virus se multiplie autant que dans les milieux contenant du plasma.
Le plasma de cobaye ou de rat n'améliore pas le milieu.
Comme leurs prédécesseurs, FRENKEL & VAN WAVEREN ont cultivé le virus aphteux en milieu tout à fait liquide : 1 partie de filtrat de virus, 1 partie de tissu, 5 parties de sérum bovin et 5 parties de solution de Tyrode. Ils obtiennent 10 passages d'une durée totale de 36 jours.
Le sérum de cheval donne de mauvais résultats, dégraissé il paraît meilleur mais n'améliore pas la culture.
Le sérum foetal de bovin favorise la culture du tissu embryonnaire et, par suite, celle du virus. Il doit être dilué dans un peu de liquide de Tyrode pour le rendre plus fluide.
La simplification extrême est réalisée par la suppression du sérum bovin ; la culture est toujours positive : 4 passages pendant 11 jours.

Désinfection des cultures

Les auteurs signalent l'inconvénient de leurs milieux simplifiés, ils s'infectent plus facilement que les cultures contenant du plasma. Celui-ci possède un certain pouvoir bactéricide. Aussi ils reprennent le plasma pour leurs cultures ultérieures.
Bien que les contaminations bactériennes des cultures n'impliquent pas nécessairement l'altération du virus, FRENKEL & VAN WAVEREN (1956) ont cherché à les éviter. Ils font agir, sur le tissu, pendant 1 à 5 minutes, de l'alcool à 50 ou 70 p. 100, [illegible] à [illegible] C., filtré sur Seitz E.K. ; ce traitement n'altère pas les tissus [illegible] fibroblastes et épithéliums [illegible]. Dans [illegible] [illegible], l'alcool à [illegible] p. 100 [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] les résultats [illegible] [illegible] alcool à 70 p. 100 [illegible] la multiplication du

virus aphteux n'est pas gêné (6 passages).

Essais d'enrichissement du milieu :

Les cultures sont additionnées de diverses substances :

- extrait de petit foetus (méthode de CARREL)
- extrait de fermentation riche en vitamine B_2
- filtrat de culture de B. coli en sérum bovin
- Bacillus subtilis
- Lactoflavine en solution très diluée
- extrait de Carotte et de feuilles
- extrait de glande thyroïde
- extrait de capsule surrénale
- extrait d'hypophyse
- Folliculine
- acide fumarique
- Glycogène
- Glucose : suppression ou augmentation dans la solution de Tyrode
- Cyanure de potassium en solution de 10^{-5} à 10^{-3}
- Fluorure de sodium de 0,05 à 0,5 p. 100.

Aucune amélioration n'est constatée par rapport aux cultures témoins.

Tissu :

Origine animale

Les explantations de la peau des foetus de mouton, de porc et de chèvre conviennent aussi bien à la culture du virus que celles des foetus de vache. FRE[illegible] importance à la culture du virus aphteux sur tissu embryonnaire de porc, animal particulièrement réceptif.
Il est intéressant d'avoir à sa disposition une grande variété de peau de même origine, [illegible] nombre important de foetus, ce [illegible] sur une grande échelle dans des conditions comparables. [illegible] grand nombre de foetus [illegible] de gestation, il est [illegible] tous les grands abattoirs. Les foetus [illegible] l'un après l'autre après avoir fait une ligature de l'utérus entre chacun d'eux.
Ils sont placés dans [illegible] leur dépouillement. Au cours du [illegible] de la peau, [illegible] prendre du tissu adipeux qui gêne les cultures.
Les résultats des cultures sur tissus ovins et porcins sont superposables [illegible] sont renouvelables (80 sur tissus bovins ou ovins, 6 sur tissus porcins).
La peau des embryons de poule n'est pas favorable : dans 5 séries de cultures faites à partir d'embryons de 12 à 14 jours, FRENKEL &

VAN WAVEREN ne mettent plus en évidence le virus après 3 heures d'incubation.

Age des embryons :

La peau de foetus de plus de 30 cm. de longueur, même de ceux recouverts de poils, donnent de bons résultats. Il est bon de recueillir la peau par curetage. La méthode est utile si l'on veut préparer de grandes quantités de virus.

Tissus embryonnaires autres que la peau :

Le bord des lèvres et l'épithélium lingual des foetus bovins donnent une bonne multiplication du virus. Le muscle, coupé au microtome, ne donne aucun résultat. Le virus peut être mis en évidence après 2 passages d'une durée totale de 9 jours sur cotylédons ou chorion. Les essais n'ont pas été poursuivis.

Tissus adultes :

FRENKEL & VAN WAVEREN ont recherché les tissus de bovins adultes pouvant convenir à la culture du virus. Les lieux de prédilection du virus indiqués chez l'animal vivant ne sont presque jamais stériles. Trois zones ont été choisies : la matrice des cornes, des onglons et l'épithélium de la langue.
Les poils de la base des cornes sont éliminés à la flamme. Par une incision circulaire, le tissu de jonction entre la base de la corne et la peau est prélevé à la pince, la corne est retirée. Le curetage de la matrice fournit un tissu qui donne un résultat positif au cours de 2 passages successifs pour les types O et A ; les passages ultérieurs sont [illegible].
La même technique de prélèvement au niveau du sabot donne des [illegible], mais la série de cultures positives est plus longue.
Les premiers essais de culture à partir de l'épithélium de la langue ne sont pas [illegible]. La couche supérieure de la muqueuse est éliminée, puis les lambeaux d'épithélium lingual sont coupés au microtome (épaisseur 25μ). Malgré la stérilisation des parties du microtome en contact avec le tissu et l'addition de cyanure de potassium [illegible], le tissu s'infecte et le virus disparaît des cultures en [illegible] passages.
Nous verrons que ce travail préliminaire a permis à FRENKEL de mettre au point la technique actuelle de culture en masse du virus aphteux qui est appelée à un très grand développement (313).

Conservation du tissu :

L'utilisation immédiate des foetus après leur récolte n'est nécessaire ni pour la culture du tissu, ni pour celle du virus. Les embryons <u>in utero</u> peuvent séjourner 7 jours à + 2° C. Cette constatation, d'un grand intérêt pratique, permet de faire des stocks pour des mises en culture en quantité importante.

Préparation du tissu :

Les fragments de peau d'une surface assez large peuvent être utilisés, mais les résultats ne sont pas aussi bons qu'avec la peau coupée en fins morceaux et les contaminations microbiennes sont plus fréquentes.

Contact virus-tissu :

Le mélange du tissu et du virus peut être conservé 6 jours à + 2° C. sans altérer le résultat des cultures.
Pour assurer une liaison plus intime du tissu et du virus, FRENKEL & VAN WAVEREN évacuent les gaz de la préparation par un séjour de 30 minutes dans un dessiccateur à vide.
L'ensemencement est pratiqué, dans certains cas, d'une façon très originale : la perfusion de colorants (trypan bleu ou rouge neutre) par la veine ombilicale prouve à FRENKEL que la peau est atteinte. L'injection de virus dans les mêmes conditions lui permet un ensemencement massif et rapide de la peau avec moins de risques de contamination. La peau est ensuite découpée puis mise en culture comme précédemment.
La technique classique est toutefois préférable.

Température :

La diminution de la température d'incubation de 37° C. à 32° C. ne paraît avoir aucun avantage. Le même résultat est obtenu en [illegible] h. à 37° ou en 3 h. à 32°.

Augmentation des quantités des composants :

Dans les expériences en vue de la fabrication de vaccin, FRENKEL & VAN WAVEREN augmentent les quantités des composants et cultivent en ballons de Kolle et en boites de Roux. Les résultats sont excellents.
Dans les boites de Roux, les quantités sont les suivantes :
5 cc. de virus - 5 cc. de tissu - 20 cc. de liquide de Tyrode - 20 cc. de sérum de bovin - 2 cc. de solution tampon phosphatée ; en ballons de Kolle les quantités sont moindres mais les rapports sont les mêmes.
Avant la mise en culture, le mélange tissu-virus reste en glacière pendant au moins 1 h.
Les cultures demeurent [illegible] h. à 37°, puis le tissu est broyé avec du sable, délayé dans la solution phosphatée et centrifugé 10 minutes à 3.000 tours-minute. Le liquide surnageant est porté par addition

de solution phosphatée, au même volume que celui du liquide de culture. Il est passé, seul ou mélangé au liquide de culture, sur filtre Seitz E K. Le filtrat est conservé à la glacière

Résultats

Le virus aphteux se multiplie sur la peau embryonnaire des mammifères artiodactyles cultivée *in vitro*. Le nombre des passages positifs l'atteste. Dans une expérience, FRENKEL & VAN WAVEREN ont calculé que le virus, type [illegible] (dilué à 1/1 000), qui sert à ensemencer la première culture, atteint une dilution de [illegible] après [illegible] d'une durée de 19 jours à 37°, sans compter la diminution dûe à la filtration à travers les filtres E K de Seitz.
Le virus cultive aussi bien sur tissus d'origine bovine (80 passages), ovine (80 passages) ou porcine (6 passages). Le type du virus reste inaltéré même après plus de 50 passages. Le virus bovin, type O, très actif, de la grande épizootie de 1937 se révèle facile à cultiver. L'activité du virus cultivé est généralement inférieure à celle de la lymphe des aphtes spontanés. Le titre varie de 1.10^{-2} à 5.10^{-4}, il est souvent aux environs de [illegible].
Le pH des cultures après [illegible] jours d'incubation oscille entre [illegible] et 6,7 (mesure électro-métrique).
Le virus de culture est capable de provoquer la fièvre aphteuse chez le boeuf, le porc et le cobaye, même après de nombreux passages. L'infection peut rester localisée au point d'inoculation, puis elle généralise [illegible]. L'intensité des réactions est variable. L'infection généralisée est suivie d'une [illegible]. Les sérums de convalescents titrent de 0,2 cc. à 0,9 cc.
Chez le cobaye, l'inoculation intracérébrale de virus A de culture (0,1 cc. au 1/50) détermine des contractions musculaires, une accélération de la respiration, un affaiblissement général. La guérison est rapide. FRENKEL & VAN WAVEREN (1935) appliquent, avec succès, leurs virus de cultures à l'immunisation anti-aphteuse passive : préparation de sérum hyperimmun, et active : virus fixe ou atténué (p. 294).

A partir de [illegible], la méthode de culture de FRENKEL & VAN WAVEREN est introduite à l'île de Lindholm.

Les travaux depuis sont dus à [illegible] (1936), TOUSSAINT (1936), FOGEDBY (1937, 1940), FOGEDBY & [illegible] (1942) et FOGEDBY & MICHELSEN (1947).

Les cultures de [illegible] & HANSEN sont faites sur peau embryonnaire de cobaye, leur titre est peu élevé (10^{-2}) mais leur virulence est aussi grande que celle du virus naturel. Ces essais sont limités ; ils ont servi aux expériences préliminaires de l'adsorption du virus de culture sur hydroxyde d'aluminium.

FOGEDBY, sur les conseils de FISCHER, modifie légèrement la technique des auteurs hollandais :
La suspension de virus de départ est, indifféremment, de la lymphe ou des parois d'aphtes de langue de bovin ; par commodité d'emploi la lymphe est préférée.
Le tissu est généralement de la peau de foetus bovin. Toutefois les auteurs danois obtiennent de bonnes cultures de virus en tissus pulmonaires et en chorion de foetus de vache. Ils préfèrent, après un grand nombre d'expériences comparatives, le tissu cutané au tissu pulmonaire. Sur le chorion de vache, difficile à broyer, le virus se développe un peu moins bien. Les essais sur tissus hépatiques sont médiocres et ceux sur tissus spléniques, rénaux et cérébraux, négatifs.
La culture est meilleure dans les tissus foetaux recueillis depuis [illegible] h. que dans ceux extraits depuis 24 h. Les tissus sont conservés sans inconvénient 24 à 72 h. à + 2° C.
Le liquide nutritif peut être du plasma ou du sérum. Les cultures sont bonnes, mais plus capricieuses, avec seulement du liquide de Tyrode. Actuellement, après de nombreux essais FOGEDBY & MICHELSEN utilisent, de préférence, le plasma.

La préparation type des cultures est la suivante : dans une boîte de [illegible] de 12 cm. de diamètre il est déposé :

- 1 cc. de suspension de lymphe aphteuse bovine à 1/30 [illegible]
- 1 gr. de peau de foetus bovin, découpée aux ciseaux pendant 10 minutes
- 2 cc. de solution de Tyrode
- 1 cc. de plasma hépariné [illegible]

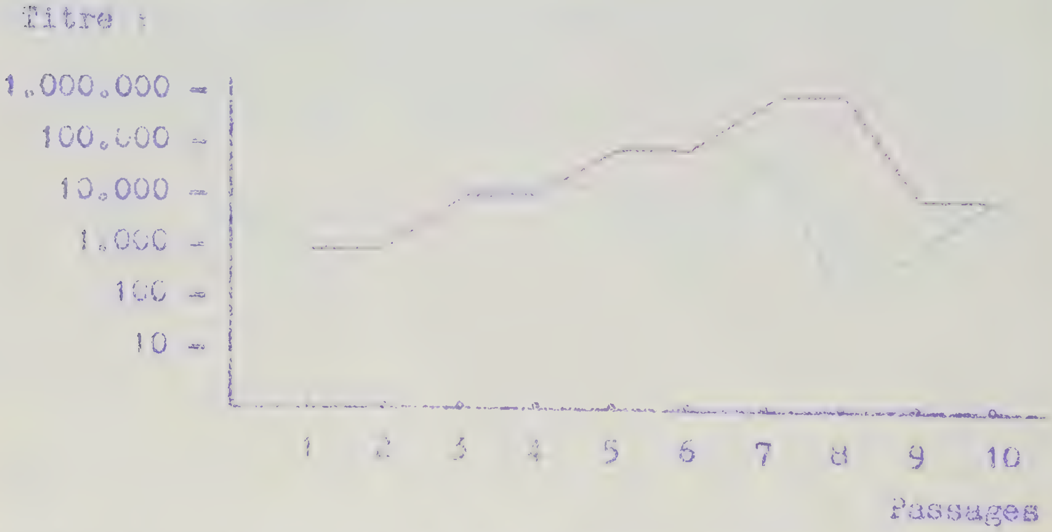
[illegible] d'environ 15 cc. La boîte [illegible] est placée à 37° [illegible].
[illegible] incubée est broyée en totalité, [illegible] de 15 cc. [illegible] phosphatée tamponnée ; 1 cc. [illegible]

[illegible]

[illegible] Tous [illegible] ont été interrompus très rapidement, la virulence du virus

s'est vite atténuée, peut-être en raison d'une mauvaise récolte du tissu. Deux autres séries ont été arrêtées au 7ème passage, elles étaient alors avirulentes. Les 15 autres cultures ont donné de bons résultats, elles ont été arrêtées volontairement. La première a été poursuivie jusqu'au 60ème passage, la deuxième jusqu'au 54ème.

Voici l'évolution de la 12ème série dont le virus O bovin de départ avait un titre de 10-4 :



Le trait vert correspond aux dilutions ayant provoqué des lésions de généralisation (au moins un cobaye sur deux), lors du titrage ; le trait rouge aux dilutions n'ayant provoqué que des lésions primaires.

Au cours des premiers passages le titre baisse, il remonte dans les passages ultérieurs. C'est, d'après FOGEDBY & [illegible], une "crise d'adaptation" qu'ils ont retrouvée au début de chacune de leur série de cultures.

Le virus cultive réellement : il est dilué à 5,9.10-14 au 10ème passage et son titre, au 1er et au 10ème passage est le même : 10-4.

Au cours de la première série de 60 passages il y a eu également une multiplication du virus, puisque le virus de départ a été dilué à 4,29.10-[illegible]. Il était, à l'origine, actif à 10-4 et, au 60ème passage, à 10-[illegible].

Le virus a conservé son titre d'origine 10-4 jusqu'au [illegible]ème passage, sauf au cours des 22 et [illegible]ème passages où il augmente (10-[illegible]), puis ensuite il subit une certaine atténuation (10-[illegible], 10-[illegible]).

Lors de la 2ème série, le titre (10^{-5}) est resté à peu près constant jusqu'au 23ème passage.

La durée optimum de la culture est d'environ 48 h ; FOGEDBY & MICHELSEN publient le tableau suivant :

Heures de culture :	36	-	40	-	48	-	64	-	72	-	88
Exposant du titre :	1	-	3	-	6	-	5	-	3	-	1

Certaines expériences leur montrent des irrégularités : titre (10^{-4}) constant de 24 à 72 h., ou virus indécelable à la 90ème heure de culture, trace à la 64ème heure, [illegible] à la [illegible] heure et [illegible] à la [illegible] heure. Ils attribuent ces faits à l'inconstance de la composition des cultures et, en particulier, aux tissus. D'après leurs derniers travaux, ils conseillent de poursuivre les cultures 56 à 58 h.

Au cours de 5 cultures, le pH, légèrement alcalin au départ (voisin de 8), s'acidifie progressivement (6,7 - 7). Dans deux d'entre elles un léger retour vers l'alcalinité s'est produit, mais sans suite durable.

Le moment de la multiplication maximum coïncide avec celui où les cultures ont un pH pas éloigné de 7,6, pH optimum de conservation du virus aphteux ; c'est à la 40ème heure pour 2 cultures et aux 54ème, [illegible] et [illegible] heures pour trois autres. La fixation du pH par un tampon de véronal à faible dose donne quelques résultats encourageants.

Au cours de longues séries de cultures (60 passages par exemple les qualités du virus ne se modifient pas : aucune différence n'est perceptible, au point de vue pathogène, avec le virus bovin naturel. Le virus de culture détermine, chez le bovin, une fièvre aphteuse typique suivie d'une bonne immunité. Le type reste stable, il ne se produit pas de "mutations". La concentration du virus à partir des cultures semble possible par les procédés physico-chimiques : précipitation, adsorption.

Le virus de culture en suspension dans eau phosphatée à 1/30 et pH 7,6 conserve quelques mois ; la glycérine semble augmenter sa virulence (voir p. [illegible]). FOGEDBY & MICHELSEN ont relevé des résultats curieux dans la virulence des cultures : des dilutions relativement concentrées provoquent des lésions aphteuses moins importantes que des dilutions fortement étendues (voir p. [illegible]).

Le virus de culture a servi aux auteurs danois pour de nombreuses immunisations passives et actives. Il a les mêmes qualités antigéniques que le virus d'aphtes, mais il est moins concentré et doit, de ce fait, être employé à plus forte dose.

FOGEDBY & MICHELSEN ont cherché à compenser la dépression

physiologique des tissus dûe à leurs prélèvement, conservation, changement d'habitat, en stimulant les éléments cellulaires par des additions diverses.
Ils ajoutent, aux cultures de type habituel, sans résultat par rapport aux cultures témoins, de 1 à 5 cc. :
- d'extraits embryonnaires : broyats d'embryon de poulet de 10 jours, macérés, dilués à parties égales en solution de Ringer et conservés à la glacière,
- d'extraits de poumon, rate et thymus d'embryon bovin préparés dans les mêmes conditions,
- d'hormones gonadotropes,
- de broyage de thyroïde de veau.

Ils améliorent le titre dans 4 essais de cultures sur 4 par addition de 1, 2, 3 ou 4 cc. d'extraits de muqueuse d'intestin grêle : des lambeaux d'intestin grêle de vaches sont prélevés, la muqueuse est lavée et grattée au couteau, le tissu épithélial est trituré et mis à macérer, à 2° C., dans la solution de Ringer ; le liquide est centrifugé et filtré pour le stériliser.

Le titre est augmenté de 10 fois, dans 3 expériences sur 4, par addition, aux cultures, de 0,5 p. 1.000 de bromure de potassium. L'augmentation de pouvoir pathogène est évidente (également dans la 4ème expérience) tous les cobayes font une fièvre aphteuse plus grave que les témoins.

L'addition de 0,10 milligramme d'arséniate de sodium donne, dans le tiers des cultures, une récolte de virus supérieure de 10 p. 100 à celle des cultures non traitées.

Les auteurs danois stimulent directement le tissu avant la mise en culture par application des données de LOEB sur la parthénogénèse. Avant la mise en culture dans un milieu isotonique, le tissu, coupé en petits fragments, est soumis à des bains d'eau salée hypertonique, puis lavé en solution de Ringer. Le titre est sensiblement amélioré si la solution de chlorure de sodium est faible et si la durée du bain est courte.

Conditions et résultats de la culture du virus aphteux sur cultures de tissus

La culture du virus aphteux réussit par de nombreux procédés. Le grand nombre des techniques rend difficile l'édification d'une synthèse groupant les conclusions auxquelles sont arrivés les différents expérimentateurs. Sans entrer dans le détail des expériences et des interprétations nous avons essayé d'en rassembler les résultats, l'uniformité de ceux-ci leur confère une certaine valeur.

Conditions requises pour obtenir une culture du virus aphteux sur cultures de tissus :

Choix de la technique :

Les techniques importent peu puisque, nous l'avons vu, elles sont toutes utilisables, qu'elles soient de CARREL, de MAITLAND ou leurs dérivées en gouttes pendantes, flacons, [illegible] de Roux etc.... La seule exigence formelle est la présence de cellules vivantes et réceptives. La multiplication cellulaire n'étant pas nécessaire, les méthodes type Maitland, plus simples, [illegible], ont été choisies de préférence.
La technique de BORCILA est à retenir, les déchets du métabolisme de la culture qui [illegible] diffusant à travers une membrane de cellophane, le titre du virus augmente par rapport aux cultures témoins.

Composition des cultures

<u>Virus</u> :

La lymphe prélevée dans des aphtes non rupturés de [illegible] de bovins ou de coussinets plantaires de cobayes est le matériel de choix. Il est possible de l'inoculer non filtrée si elle est recueillie stérilement. La paroi épithéliale des aphtes broyée au mortier en présence de sable doit être filtrée sur bougies Chamberland, Berkefeld ou disques Seitz.
Lymphe, broyage de parois d'aphtes sont dilués de 1.10^{-1} à 1 [illegible] mande de ne pas se servir de lymphes conservées plus de 24 h.

[illegible] le plasma [illegible] mique chez [illegible] du cobaye [illegible] virus n'étaient pas les [illegible] il conseillait d'inoculer du [illegible] virus. Si le sérum a un titre moins [illegible] d'aphtes, il a l'avantage de pouvoir être [illegible] inoculé tel quel, sans dilution ni filtration.

Milieu :

Solutions salines physiologiques:

Les [illegible] de Tyrode, [illegible] de Ringer, de Locke, de J.-André Thomas, sont employés avec succès. Le pH est ajusté de 7,6 à 8, le plus souvent à 7,6. Le liquide [illegible], [illegible] plasma, ni sérum, a permis à STRIEGLER, puis à NAGEL, de cultiver du virus de culture in vitro (d'au moins 3 passages sur milieu de Maitland) [illegible] est limité et la virulence diminue sensiblement ; les cultures avec sérum ou plasma donnent un meilleur rendement. FRENKEL, puis FOGEDBY & MICHELSEN ont obtenu les mêmes résultats avec le liquide de Tyrode.

Les liquides physiologiques ont intérêt à contenir du sulfate de magnésium.

[illegible] par le liquide amniotique est bon, mais l'incubation du virus est plus longue ; le lait est nuisible (FRENKEL).

Solutions tampons :

Elles sont toujours à base de phosphate de sodium ou de potassium. FRENKEL préfère la solution M/5 à celle M/15 ; il obtient des cultures opaques en remplaçant le phosphate de sodium par le carbonate de calcium, mais sans meilleur résultat.

Plasma

Les plasmas de cobaye et de bovin héparinés à 1 p. 10.000 [illegible] tissus et virus mis en culture convien[illegible]lement le plasma de coq ; le plasma [illegible] animal réfractaire au virus aphteux et [illegible] le sont aussi en culture, ne nuit [illegible] ce virus sur tissus de cobaye ([illegible] FRENKEL & VAN WAVEREN). Le plasma de [illegible] amélioration. FRENKEL remplace [illegible] positifs, le plasma par du liquide [illegible] 1,5 p. 100 de gélose et du sérum [illegible]

Sérum

[illegible] Les cultures du virus en sérum [illegible]rum de cobaye frais, ou [illegible] [illegible]ines à l'obscurité à 2 ou 18°, [illegible] de cobayes réussissent, contrai[illegible] avec du sérum chargé de graisse, [illegible] Le titre du virus type O en

[illegible]
passage [illegible].

Le sérum de bovin permet la [illegible] mais le titre est 10 fois moins élevé. Le sérum de cheval, [illegible], ne convient pas.

Les cultures liquides sur [illegible] doivent être faites en sérum de [illegible]. Le sérum de foetus bovin dilué en liquide de Tyrode facilite les cultures (FRENKEL & VAN WAVEREN).

Les résultats sont pratiquement semblables en milieux solide (plasma) et liquide (sérum) [illegible].

Extraits embryonnaires :

Ils ne sont pas indispensables, aussi n'ont-ils pas [illegible] objet de nombreuses recherches.

HECKE et les auteurs allemands prennent l'extrait [illegible] de 3 jours dilué au 1/20, [illegible] des extraits de cerveau et de muscle d'embryon de foetus bovin.

Tissus :

Tissus embryonnaires :

Pour HECKE, M. & H. MAITLAND, FRENKEL & VAN WAVEREN, les tissus d'embryons de poule sont réfractaires, alors que ceux de foetus de cobaye (HECKE & MAITLAND), de vache, de brebis, de truie, de chèvre (FRENKEL & VAN WAVEREN) sont très favorables. En principe, le virus [illegible] (KOBE & FERTIG).

L'âge est important, le foetus de Cobaye doit avoir [illegible] nes (BORREL), peser de 7 à 10 gr. (STRIEGLER), de 12 à 18 gr. [illegible] [illegible] à 5 mois environ [illegible] tats avec des foetus de 30 cm. et il s'est assuré que la culture était encore possible avec les [illegible].

Les tissus embryonnaires [illegible] adultes, en raison de la facilité [illegible] fait, nous l'avons signalé, qu'ils [illegible] ture des virus.

Les tissus d'embryons d'animaux [illegible] teuse ne sont pas tous aptes à la culture [illegible] broyage total d'embryon de cobaye donne d[illegible] (MAITLAND). Les [illegible] KOBE & FERTIG, FRE[illegible] périences comparatives [illegible]
de peau ou [illegible]

La peau d'embryon est le tissu qui donne le plus satisfaction, tous les expérimentateurs l'adoptent après comparaison avec les autres tissus. Les lieux de prédilection *in vivo* du virus aphteux : langue, lèvres, gencives, matrice des onglons des foetus bovins ou coussinets plantaires des embryons de cobayes sont, bien entendu, particulièrement aptes à sa culture (M. & H. MAITLAND), mais la quantité de virus obtenue est faible par rapport à celle donnée par la peau : 200 gr. par foetus de 15 à 20 cm.
La peau est prélevée au niveau de l'encolure, du dos, du flanc et des cuisses. Il est curieux de constater [illegible] présentant pas de lésions aphteuses chez l'animal *in vivo*, est aussi favorable à la culture *in vitro* que le tissu plantaire.

Les tissus pulmonaires embryonnaires offrent des conditions presque aussi bonnes que la peau (HECKE), [illegible] tanés (KOEFOED). Mais à la faveur d'un grand nombre d'expériences, FOGEDBY & MICHELSEN préfèrent le tissu cutané au tissu pulmonaire.

L'oesophage d'embryon donne à HECKE et PALMA-ZULOAGA des résultats positifs. Le chorion semble apte à FOGEDBY, KOEFOED & MICHELSEN, mais les cultures se développent un peu moins bien que sur la peau, ils lui reprochent aussi d'être très difficile à broyer. FRENKEL fait 2 passages positifs sur chorion ou cotylédons puis arrête ses cultures.

Certains tissus embryonnaires permettent peu de passages (testicule) (HECKE, PALMA-ZULOAGA) ou donnent des résultats contradictoires, selon les expérimentateurs (cerveau : résultats positifs pour TOUSSIENG, médiocres pour HECKE, négatifs pour KOEFOED - rein : positif pour MAITLAND, médiocre pour PALMA-ZULOAGA, négatif pour KOEFOED) ou sont franchement mauvais : le foie (MAITLAND, HECKE, KOEFOED), la rate (KOEFOED, PALMA-ZULOAGA), le muscle (HECKE, FRENKEL), les glandes parotides, les capsules surrénales, l'intestin grêle, la moelle osseuse, le tissu fibreux (HECKE).

[illegible]res de virus seraient [illegible] tissus foetaux conservés depuis [illegible] ceux recueillis dès le sacri-[illegible]

[illegible] tissus foetaux 5 jours à + 2° [illegible] des cellules qui gardent leur [illegible] (FRENKEL & VAN WAVEREN).

En résumé, les tissus foetaux à retenir sont la peau et, dans une certaine mesure, le poumon, de cobaye, de vache, de brebis et de porc.

Tissus adultes :

LEVADITI, NICOLAU et GALLOWAY (1926) ont déterminé les affinités tissulaires du virus aphteux chez le cobaye. 24 heures après l'injection intraveineuse de 1 cc. de solution virulente, les tissus de toutes les origines sont virulents : ectoderme (épithélium de langue et le cerveau, mais l'épithélium de la peau n'est pas encore virulent), endoderme (poumon et foie), mésoderme (sang, rate, mais le rein, le testicule et l'ovaire sont et restent avirulents), ectomésoderme (capsules surrénales). Au bout de 4 jours, seuls les épithéliums d'origine ectodermique (langue et pattes) sont virulents.

Il semblait que presque tous les tissus pouvaient être utilisés pour la culture, mais SCHAFER (1946) ayant remarqué que la masse principale du virus circulant se trouvait dans le sérum -les globules rouges lavés, d'après SCHAFER, en contiennent peu, ou pas du tout- il a éliminé le sang des organes avant leur titrage en virus aphteux. Dans ces conditions il n'a pas trouvé de virus dans le cerveau, le coeur, les poumons, le foie, la rate, les reins, les capsules surrénales, les testicules, les glandes salivaires, les ganglions lymphatiques et la musculature. Ces études *in vivo* donnent des renseignements utiles sur le choix des tissus où le virus doit cultiver. Toutefois il faut avoir présent à l'esprit que les virus cultivent mieux sur les tissus embryonnaires que les tissus adultes. Par exemple, le virus aphteux qui survit bien dans un milieu à base de sérum et de rein adulte de cobaye n'y cultive pas ; au contraire il se multiplie dans un milieu semblable contenant du rein d'embryon de cobaye ([illegible] MAITLAND). FRENKEL n'a pas réussi la culture sur cellules [illegible] d'exsudat de péritoine (lapin, porcelet, veau).

FRENKEL et VAN WAVEREN ont prouvé que la matrice des cornes et des onglons et surtout l'épithélium de la langue de bovin adulte pouvaient convenir. Les difficultés de prélèvement et de stérilité ont fait longtemps obstacle à leur utilisation, malgré toutes les précautions prises les cultures s"infectaient. Tout récemment, FRENKEL a réussi à mettre au point une technique de culture de l"épithélium de langue bovine. Nous l'exposerons en détail au chapitre des nouvelles techniques.

Proportions des composants :

Elles varient [illegible] par rapport aux formules classiques ; par exemple, [illegible] mettent, dans un flacon de Carrel, 1 cc. de mélange [illegible] de tissu, 0,165 cc. de virus, 0,6 cc. de plasma hépariné et 1,2 cc. de solution de Tyrode.

Leurs trois essais de culture en flacons de Roux avec 50 cc. du même mélange sont positifs, mais le titre est faible (1.10-3).

Les tissus en couche trop épaisse s'acidifient et se nécrosent, même s'ils sont aérés (FRENKEL). Les flacons doivent être assez grands : STRIEGLER introduit 2,2 cc. dans des flacons d'Erlenmeyer de 50 cc.

KOBE & FERTIG (1938) ont mis en évidence l'importance d'une proportion convenable de tissus à l'aide des cultures en goutte pendante, il faut, au moins 3 fragments de tissus par goutte. La quantité de tissu par rapport au milieu liquide est, pour la plupart des auteurs, de 1/10 à 1/50.

Voici les chiffres de FRENKEL pour ses cultures liquides :
1 partie de filtrat de virus - 1 partie de tissus - 6 de sérum - 5 de liquide de Tyrode et 0,5 de solution tampon. Il multiplie ces chiffres par 5 pour ses cultures en masse dans les flacons de Roux ou ballons de Kolle.

FOGEDBY & MICHELSEN, pour leurs cultures solides en boites de Pétri, prennent des quantités sensiblement voisines
1 cc. de filtrat de virus - 1,5 cc. de tissus - 4 cc. de Tyrode - 5 cc. de plasma.
Le virus de culture est conservé au 1/15 en solution phosphatée et 1 cc. du mélange sert à ensemencer 15 cc. de milieu neuf.

Comportement du virus selon les conditions de cultures :

Inoculation des cultures - contact virus-tissu :

[illegible] le tissu est mis en contact avec la solution virulente concentrée filtrée, [illegible] rature généralement basse. Si HECKE laisse le mélange virus-tissu à 37° pendant 30 minutes, le plus grand nombre des auteurs préfèrent 5° pendant 1 à 24 heures (M. & H. MAITLAND, FRENKEL, PALMA-ZULOAGA), 10 minutes (BRAGA), 5 heures (STRIEGLER).

FRENKEL & VAN WAVEREN ont vérifié qu'un contact de 6 jours à 4° ne modifiait pas le résultat des cultures. L'évacuation des gaz des préparations par l'action du vide pendant 30 minutes permet un temps de contact plus court. Ils inoculent, parfois, le virus par la veine ombilicale du foetus avant le prélèvement

de la [illegible], les [illegible] sont moins fréquentes ; ils conseillent [illegible] la méthode classique.

L'inoculation peut se faire, plus simplement, par la mise en culture de plasma [illegible] ou de sérum [illegible] virulent.

pH :

Le pH le plus adéquat est certainement 7,6. A ce pH le titre du virus aphteux est [illegible] altéré par les manipulations et sa survie est meilleure en différents milieux (Commissions anglaises).

En culture il y a toujours une acidification : de 7,[illegible] le pH tombe à 6,9 en 5 à 6 jours (HECKE), de 7,4 à 6,7 (BORCILA), de 7,6 à 6,2 (FRENKEL). Le virus de cultures de MAITLAND meurt à pH [illegible] [illegible]

[illegible] cellophane qui [illegible] est toujours inférieur à celui de la culture, [illegible] les produits acides du métabolisme.

[illegible] multiplication le plus élevé du virus correspond au pH 7,6, bien que le moment où la culture [illegible] de la [illegible] à la [illegible] heure. Par exemple, ils commencent leurs cultures aux environs de pH [illegible] ; [illegible] le pH [illegible] taux favorable 7,6 et de la 72ème à la 112ème heure d'incubation, le pH oscille entre [illegible] et [illegible] [illegible] nos expériences de culture sur foetus en survie (p. 60).

Température

La température d'incubation est aux environs de 37°, rarement au-dessus : 37° - 37°5 (MAITLAND), 38° (BRAGA). HECKE pense qu'il [illegible] à 37°, le virus se multiplie aussi bien et les phénomènes de nécrose cellulaire sont plus longs à apparaître. [illegible] était illusoire puisque la durée de culture est plus longue : le même résultat est obtenu en 2 h. d'incubation à 37° ou en 3 h. à 32°. Le virus aphteux ne prolifère pas à 26° (HECKE).

[illegible]

Les renseignements sont pauvres : l'action de l'oxygène, les facteurs d'oxydo-[illegible] et les conditions d'anaérobiose [illegible] étudiés par EDWARDS sur la survie du virus aphteux. PLOTZ pense que les cellules fonctionnent comme des régulateurs de potentiel [illegible] tant le niveau d'oxydo-réduction. M. et H. MAITLAND remarquent [illegible]

[illegible] (FRENKEL) est probablement un facteur du succès de la technique ; il n'est pas le seul, puisque les premières expériences de FRENKEL par sa méthode d'aération n'ont pas réussi.

L'addition de cyanure de potassium en solution très diluée provoque une paralysie respiratoire, elle n'a pas d'action sur le résultat des cultures.

Addition de diverses substances :

Il s'agit souvent de "coups de sonde" sur un petit nombre de cultures [illegible]. Les résultats [illegible] être considérés comme [illegible].

[illegible], les cultures [illegible], les [illegible] (MAITLAND) [illegible] (FRENKEL) paraissent avoir un rôle intéressant. Le glucose (MAITLAND) hâte le temps de croissance du virus, mais provoquerait plus rapidement sa mort. La trypsine a le même effet mais la destruction du virus est plus lente (MAITLAND). KOEFOED obtient une récolte de virus supérieure de 10 p. 100 dans 1/3 des cultures contenant 1/10 de milligramme d'arséniate de sodium. L'addition de [illegible] ou d'extrait de muqueuse d'instestin grêle de vache, détermine une légère augmentation du titre et du pouvoir pathogène (FOGEDBY & MICHELSEN). FRENKEL n'obtient aucune amélioration, par rapport aux cultures témoins, avec l'addition de toute une série de substances :

- vitaminiques : lactoflavine en solution très diluée, extrait de [illegible], extrait de fermentation riche en vitamine B_2,
- hormonales : extrait de glande thyroïde, broyage de thyroïde de [illegible] (FOGEDBY), extrait de capsules surrénales, extrait d'hypophyse, hormones gonadotropes (FOGEDBY), folliculine,
- bactériennes : filtrat de cultures de E. coli en sérum bovin, B. subtilis,
- diverses : glucose en quanti[illegible], acide fumarique [illegible], fluorure de sodium [illegible].

La stimulation des fragments de tissus par immersion dans des solutions [illegible] améliore le titre des cultures [illegible] ; ces expériences de FO[illegible] ne sont pas assez développées pour être concluantes.

Quant à l'addition d'extraits embryonnaires de

poulet, au point de vue action stimulante sur la culture du virus aphteux, la majorité des auteurs la trouve inutile : M. & H. MAITLAND ont prouvé que le virus aphteux, pour cultiver, n'a pas besoin de cellules en multiplication. HECKE a abandonné la technique de CARREL. STRIEGLER, BORCILA, FRENKEL & VAN WAVEREN, FOGEDBY & MICHELSEN... confirment les résultats anglais. Les extraits embryonnaires homologues donnent des résultats plus discutés : ceux de petits foetus entiers de bovin ou de cobaye ou les broyages de poumon, rate, thymus d'embryons bovins sont sans action pour FRENKEL & VAN WAVEREN ou FOGEDBY & MICHELSEN. Au contraire, BRAGA et PALMA-ZULOAGA affirment que les extraits d'embryon entier de cobayes ou de muscles et de cerveaux de foetus de bovins stimulent leurs cultures.

En résumé, aucune substance ne paraît avoir une action stimulante certaine. Les essais sont insuffisants, mais les tentatives préliminaires semblent peu encourageantes.

Résultats :

Il faut souligner l'uniformité des résultats des nombreux auteurs et des diverses séries de cultures d'un même auteur. Les conclusions sont d'autant plus remarquables que les techniques, les tissus, les virus, peuvent être différents.

La multiplication du virus aphteux en cultures de tissus, prouvée simultanément par HECKE et par M. & H. MAITLAND a été maintes fois confirmée par la suite.

Le virus persiste bien plus longtemps qu'une simple survie ne le lui permettrait dans les conditions de température, de dilution, de filtration, de milieu, qui sont celles des cultures.

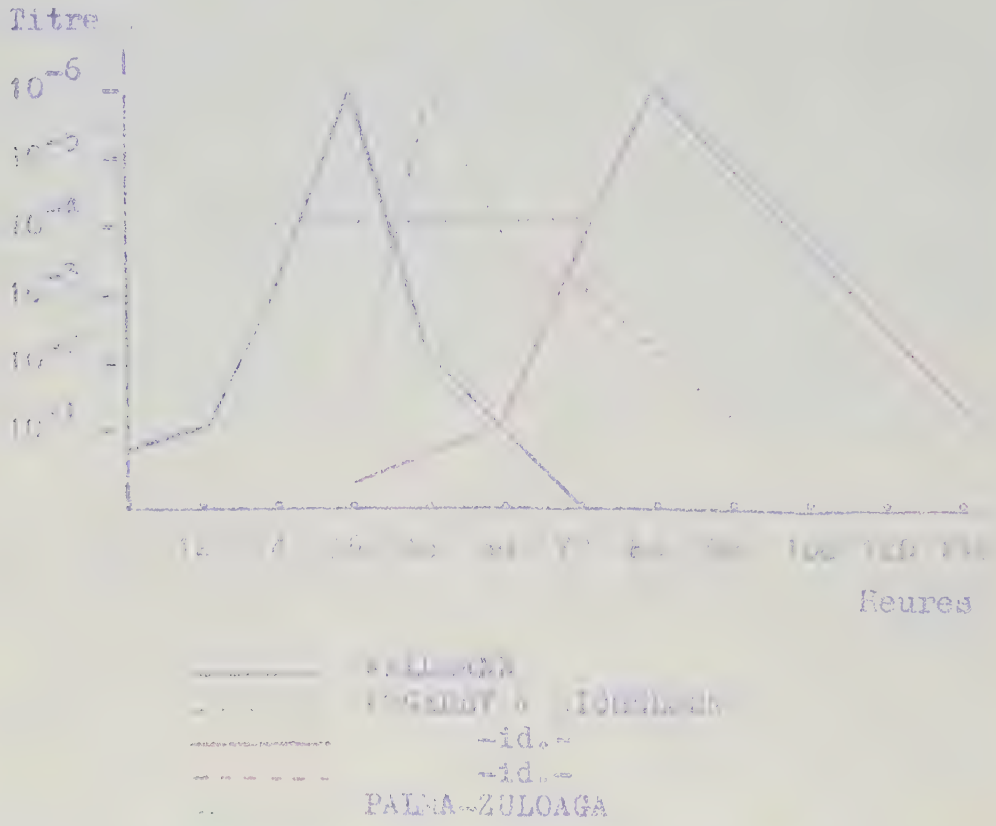
Résultats quantitatifs :

Multiplication du virus aphteux en fonction de la durée de la culture :

La multiplication du virus commence de la 15ème à la 24ème heure, atteint son maximum à la 48ème heure, ensuite la quantité de virus diminue jusqu'au 5ème ou 6ème jour (MAITLAND). Pour contrôler cette multiplication, il suffit de rechercher le titre du virus des cultures par inoculations aux cobayes ou aux bovins. Le moment de la croissance maximum, qui doit être celui du prélèvement, est variable avec les auteurs : 30 à 36 h. ([illegible]), 20 à 50 h. (BORCILA), 46 à 56 h. (FOGEDBY & MICHELSEN), 50 à 72 h. (HECKE, M. & H. MAITLAND), 24 à 96 h. (FRENKEL), 36 h. (STRIEGLER, BRAGA), 76 à 110 h. (PALMA-ZULOAGA).

Ces résultats disparates peuvent tenir, soit à la composition différente des tissus, soit aux techniques diverses de cultures. FOGEDBY, avec une même technique, obtient des moments de croissance maxima différents : 48, 84 h. ou courbe en plateau de 24 à 72 h.

Nous reproduisons les résultats de divers auteurs dans le graphique suivant



Dans ces conditions, on ne peut donner qu'une durée d'incubation approximative ; entre 36 et 96 heures en conseillant, comme le font FOGEDBY & MICHELSEN, le temps moyen de 48 à 60 heures pour récolter le virus au moment de son taux de culture maximum.

Importance des repiquages :

Le virus aphteux persiste 5 jours dans une culture de tissu sans repiquage. Si le tissu et son virus sont repiqués en même temps dans un milieu neuf (plasma, solution physiologique et extrait embryonnaire) le virus peut être mis en évidence pendant 16 jours. Cette courte survie s'explique par la dédifférenciation cellulaire au cours des passages, le virus ne trouve plus ses matériaux cellulaires indispensables. Seul le repiquage du virus extrait de la culture sur un milieu complet avec tissu permet une survie qui peut, théoriquement, être indéfinie.

Culture du virus aphteux au cours d'une série de passages :

Par prélèvement du virus, sur une culture, au moment propice, et repiquage sur milieu neuf, le virus peut être entretenu pendant très longtemps.

Généralement le virus est repiqué tous les 2 ou 3 jours ; entre 2 repiquages il peut être conservé à la glacière pendant un temps plus ou moins long : jusqu'à 3 mois (MAITLAND). La multiplication du virus au cours d'une vingtaine de passages a été réalisée plusieurs fois, par de nombreux auteurs, avec des techniques différentes. Les très longues séries de cultures sont plus rares : STRIEGLER & NAGEL ont atteint 50, FOGEDBY 60, FRENKEL 80 et STRIEGLER 118 passages (ces derniers en 2 ans). Il n'y a aucune impossibilité, semble-t-il, d'entretenir indéfiniment une souche de virus, si les conditions de culture sont adéquates.

Variation de l'infectuosité au cours des cultures :

La mesure de l'infectuosité est, pour le moment, chiffrée par le titre du virus, autrement dit par la recherche de la plus forte dilution infectante.

Le titre du virus varie au cours des cultures et des passages. L'observation des courbes du titre en fonction du temps, pendant une culture, montre que le titre d'un virus, inappréciable au cours des premières heures, peut atteindre 10^{-6} et redescendre rapidement.

Le titre maximum de chaque culture est seul considéré au cours d'une série de cultures. Il oscille dans d'assez grandes proportions, surtout pendant les premiers passages, puis, malgré une stabilité générale, n'est jamais égal. Cette variabilité est également observée au cours des passages expérimentaux ou naturels de virus de cobaye à cobaye ou de bovin à bovin. STRIEGLER constate qu'un virus actif à 10^{-5} tombe, au 5ème passage, à 10^{-2} et atteint 10^{-5} au 100ème passage. Un virus qui titre 10^{-4} au départ d'une série faite par FOGEDBY & MICHELSEN diminue à 10^{-2} au 1er passage, retrouve 10^{-4} aux 3, 4, 5ème passages et acquiert son titre maximum : 10^{-5} au 7ème passage. Tous les titres de 0 à 10^{-5} sont observés au cours de 15 passages effectués par HECKE. Pendant de très longues séries de passages on peut dire que, d'une façon générale, le titre baisse dans les premiers passages, puis augmente et atteint son maximum vers le 10ème passage, diminue alors et reste à peu près stable pendant une cinquantaine de passages, il diminue de nouveau, puis se stabilise.

Au moment de son titre maximum on peut observer une multiplication du titre du virus d'origine de 100 à 10.000 fois (MAITLAND). En culture pure de cellules épithéliales, le titre augmente par rapport à celui des cultures habituelles, toutefois les oscillations du titre sont maintenues (KOBE & FERTIG).

Les titres les plus élevés cités par les différents expérimentateurs sont de l'ordre de 10^{-5}, rarement 10^{-6}, pour FRENKEL & VAN WAVEREN ils ne dépassent pas souvent 10^{-4}.

La variation du titre au cours des cultures est différente selon les types de virus ; STRIEGLER & NAGEL ont montré que le titre du virus O a tendance à diminuer, alors que celui du virus C s'élève au cours des passages. Ces variations du titre (infectuosité) sont en raison inverse de la virulence (rapport des lésions locales aux lésions générales).

En résumé, le titre est très irrégulier au cours des cultures, c'est un inconvénient qui impose des titrages continuels. Autre difficulté le titre est bas, dans la majorité des cas il est de 10^{-3} – 10^{-4} en moyenne, toujours inférieur à 10^{-6}.

Preuve de la multiplication du virus :

La preuve la plus évidente est fournie par l'activité du virus après un grand nombre de passages. Par exemple, dans une expérience de FOGEDBY & MICHELSEN, le virus d'origine du premier ensemencement (1 cc. au 1/30) a un titre connu (10^{-4}), au 60ème passage, ce virus se trouve dilué à $4{,}29.10^{-88}$ et cependant son titre est de 10^{-3}. Malgré cette dilution théorique énorme, l'activité des passages postérieurs au 3ème ne peut s'expliquer que par une multiplication constante du virus. Les exemples sont nombreux et uniformes qui confirment cette multiplication : dilution du virus d'origine de $6{,}8.10^{-20}$ au 12ème passage positif (HECKE), $4{,}8.10^{-39}$ au 17ème passage, malgré 15 filtrations, 9 mois de conservation à la glacière ou à l'étuve (MAITLAND), 10^{-113} au 62ème passage en 316 jours ([illegible]).

PALMA-ZULOAGA insiste sur le fait qu'il ne s'agit pas de la conservation de la vitalité du virus, puisque celle-ci disparaît en 4 jours à 37° si le virus est en liquide physiologique ; en 6 jours dans une culture de tissus non repiquée à 37°, et que le virus reste vivant après 480 heures à 37° en cultures de tissus repiquées.

Les travaux de la Commission anglaise avaient prouvé qu'il fallait dépasser 3 passages positifs pour être assuré de la multiplication du virus.

Rapport entre la multiplication du virus et celle des cellules :

Il existe une relation très étroite entre le virus et la cellule, cette intimité est prouvée par les constatations suivantes : le virus ne cultive qu'en présence de cellules vivantes, il meurt si la cellule meurt,

il est protégé par la cellule contre le sérum immun, son titre est proportionnel à la finesse du broyage des cellules, il est plus abondant dans les cellules que dans les milieux liquides.

La multiplication des cellules n'est pas nécessaire à la culture du virus aphteux (M. & H. MAITLAND) ; les deux croissances (tissus et virus, ne sont pas parallèles. Le virus se multiplie plus vite que les cellules (HECKE).

FOGEDBY & [illegible] ([illegible]) apportent des précisions expérimentales : les cultures sont faites en gouttes pendantes avec de la peau d'embryon bovin, du plasma et de l'extrait embryonnaire d'origine aviaire ; elles sont inoculées par de la lymphe aphteuse bovine en plasma aviaire ; l'incubation à 37° dure de 48 à 72 h. puis le repiquage est pratiqué.

Au 5ème passage 47 cultures sont examinées au microscope et réparties en 3 groupes :

- cultures sans prolifération,
- cultures avec prolifération limitée aux fibroblastes,
- cultures avec prolifération certaine des cellules épithéliales et des fibroblastes.

Les 8 cultures les plus caractéristiques de chaque groupe sont mélangées, par groupe, broyées et titrées par inoculation au Cobaye. Le titre est le même dans chaque groupe. "Le degré de "multiplication des cellules n'est pas d'une importance capitale "pour la multiplication du virus aphteux". (FOGEDBY & [illegible]). Seule la vitalité cellulaire est indispensable.

Rendement :

Le rendement en poids du virus, autrement dit le rapport entre le poids [illegible] et celui du virus recueilli (à titre égal) est très approximativement de 5 à 20 p. 100. Les [illegible] de BORCILA par élimination des déchets du métabolisme des cultures tendent à montrer qu'une amélioration du rendement peut être envisagée par des techniques appropriées.

Les quantités de virus recueillies par culture sont faibles [illegible] quelques [illegible] par flacon, pour FOGEDBY & [illegible]. Les quantités des milieux, en flacons de Roux, ne dépassent pas 50 [illegible] ([illegible]). Il faut un nombre considérable de cultures pour obtenir des quantités intéressantes. C'est ainsi que [illegible], STRIGALAK a produit [illegible] 1,5 à 2 l et [illegible] litres [illegible]. Ces chiffres sont encourageants mais ils doivent être améliorés pour assurer une production industrielle.

Résultats qualitatifs

Période d'adaptation

Le virus aphteux passé sur un tissu en culture subit une adaptation. Il faut généralement 5 à 10 passages pour que la prolifé- [illegible] ([illegible]).

Cette accoutumance du virus au nouveau milieu, avant la récupération de son énergie de multiplication normale, n'est pas spéciale au virus de culture, l'adaptation du virus bovin d'étable passé sur le cobaye, ou vice-versa, se traduit par une période d'infection difficile, les premiers passages sont laborieux, les lésions peu étendues et fugaces.

L'adaptation d'un virus aphteux à la culture <u>in vitro</u> est fonction des souches qui s'adaptent avec plus ou moins de facilité.

Virulence :

Pour le plus grand nombre des expérimentateurs, le virus de culture, après la période d'adaptation et au cours d'un nombre limité de passages, ne présente de modifications ni de son pouvoir pathogène, ni de sa contagiosité. Un virus entretenu sur cobayes cultivé sur tissus de cette espèce, garde ses propriétés vis-à-vis du Cobaye (HECKE, MAITLAND), il reste peu actif sur le Bovin ne provoquant qu'une infection locale, rarement une généralisation atténuée. De même un virus d'origine bovine cultivé sur peau embryonnaire de mammifère artiodactyle provoque une fièvre aphteuse typique sur les mammifères réceptifs (FRENKEL, FOGEDBY - MICHELSEN, BRAGA, PALMA-ZULOAGA), mais il est peu virulent pour le Cobaye. La pathogénie, les symptômes et les lésions sont identiques qu'elles soient produites par le virus de culture ou le virus d'étable.

Les qualités d'un virus aphteux entretenues sur une espèce, ne sont pas modifiées vis-à-vis d'une autre espèce par la culture <u>in vitro</u>, par exemple le virus de cobaye cultivé <u>in vitro</u> récupère, par passages sur le bovin, sa virulence et sa contagiosité normales pour le bovin, tout comme le virus entretenu <u>in vivo</u> sur le cobaye. Plus le passage <u>in vitro</u> d'un virus bovin sur tissus de cobaye est récent et le nombre des passages réduit, plus la régénération de ses propriétés pour le bovin est rapide (WALDMANN & REPPIN).

Variation de la virulence :

Oscillations de l'intensité de la virulence :

Au cours des passages, le virus provoque, tantôt des lésions de forte intensité avec généralisation, tantôt des lésions [illegible] le virus entretenu toujours sur la même espèce, dans les mêmes conditions, subit des variations de son

[illegible] la même fréquence, par [illegible] [illegible] : de cobaye à cobaye, [illegible] et [illegible] au cours d'épizootie de bovin à bovin. [illegible]

[illegible]

La virulence d'un virus paraît s'atténuer après un [illegible] nombre de passages, le type des virus semble jouer un rôle [illegible]tant.

Les premières cultures de HECKE se sont arrêtées vers [illegible] gues, le pouvoir pathogène des virus de types O et C s'att[illegible] [illegible] A augmentait (culture poursuivie pendant 11 mois). Souvent [illegible]

Il peut se [illegible] [illegible] culture sur la peau du cobaye. Le virus du type O, par pass[illegible] *in vitro* a un devenir inverse.

[illegible] pouvoir pathogène est notablement atténué, l'intensité des ré[illegible] est variable ; ce virus provoque, le plus souvent, une fièvre [illegible]teuse bénigne. Nous verrons qu'ils l'ont utilisé comme vaccin.

[illegible] atténuée ayant perdu son pouvoir pathogène et conservé son [illegible] immunisant pour utiliser ce virus directement comme vaccin. [illegible] tissus de cobaye perd, en grande partie, son pouvoir de con[illegible] [illegible] à fait médiocre. Ce[illegible] cobaye ou tissu de [illegible] virus cultivés sur t[illegible] vent, après 60 passages, [illegible] fièvre aphteuse typique, ils sont équivalents au virus bovin naturel.

·riation de l'affinité du virus pour les espèces, les tissus et les cellules :

Nous avons vu l'affinité très étroite du virus aphteux pour les mammifères artiodactyles et le cobaye, ainsi que pour les tissus ectodermiques et les cellules épithéliales. Cette sélection se retrouve intégralement pour le virus de culture inoculé aux animaux.

La culture <u>in vitro</u>, même après un grand nombre de passages, ne modifie pas les affinités classiques du virus aphteux. L'adaptation à une espèce est réversible par un nombre de passages plus ou moins grand. Tout au plus l'affinité est-elle plus souple après culture <u>in vitro</u> : un virus bovin de passage difficile sur le cobaye peut s'adapter plus facilement à cette espèce après quelques passages <u>in vitro</u>, nous avons retrouvé ce fait par nos cultures sur peau de foetus en survie.

TOUSSIENG n'a pas réussi à provoquer une dériva- [illegible] par passages in vitro sur tissu cérébral, le virus n'augmente pas de virulence au cours des passages ; l'inoculation intracérébrale de ses cultures n'était pas suivie de symptômes nouveaux. Ces résultats ne concordent pas avec ceux obtenus par NAGEL et ses successeurs par passages <u>in vivo</u> sur le cerveau de souris ; nous avons vu que le virus perd son dermotropisme et acquiert un neurotropisme prononcé.

Les résultats de KOBE & FERTIG (1936) prouvent, toutefois, qu'il est possible de faire varier l'affinité du virus aphteux <u>in vitro</u>. Le virus, proliférant sur cultures pures de cellules épithéliales de l'iris, ne peut plus, au bout de quelques passages, cultiver sur la peau. Le virus aphteux, à l'exemple d'autres [illegible] ...ais favorable, augmenter son affinité pour ce tissu et, en même temps, la diminuer pour ses tissus de prédilection.

Observations paradoxales :

Nous devons signaler trois faits importants dont l'origine et la signification sont, en [illegible] inconnues.

Perte momentanée de l'activité du virus en culture.

Il s'agit de la disparition totale du pouvoir pathogène (infectuosité et virulence) observée, parfois,

au cours des premiers passages, pendant la "phase d'adaptation" des auteurs danois. Le virus est "sous-virulent" (HECKE), on ne peut plus le déceler par inoculation aux cobayes pendant 1 à 2 passages ; or il reste vivant puisque ses qualités réapparaissent au cours des passages suivants. Cette forme "inapparente" du virus est d'une importance théorique capitale, mais elle n'a pas fait, à notre connaissance, l'objet d'une étude approfondie.

Les dilutions fortement étendues ont une virulence plus grande que les dilutions plus concentrées :

Ce fait est souligné par FOGEDBY & MICHELSEN à l'occasion de l'épreuve de virulence de leur culture. Ils publient un tableau si caractéristique que nous le reproduisons :

Cobayes	Dilution du virus 10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
1	+	+	0	0	+++XX
2	0	0	0	+	++XX
3	+	+	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	+	0	+++XX
6	0	++	++	0	++XX
7	0	+	0	++XXX	+++XX
8	0	++	+XX	++XXX	+++XXX

+ : aphtes primaires, 1/3 du coussinet plantaire
+++ : coussinet plantaire entier
X : généralisation
XXX : généralisation totale (3ème patte postérieure, 2 pattes antérieures et langue)

Pour les auteurs danois ces résultats peuvent s'expliquer par la présence d'anticorps spécifiques dans la culture. Ces anticorps ne proviennent pas des éléments introduits dans les cultures (en particulier le plasma), car ceux-ci sont recueillis sur des animaux non vaccinés et n'ayant jamais eu la fièvre aphteuse ; les anticorps seraient donc élaborés dans les cellules des cultures stimulées par l'apport du virus. FOGEDBY & MICHELSEN pensent que les anticorps peuvent être formés par les cellules de tous les tissus et non seulement par les cellules réticulo-endothéliales.

La séparation du complexe virus-anticorps formé _in vitro_ pourrait se faire seulement par une dilution poussée de la suspension ; cette constatation a déjà été faite pour les mélanges toxine-antitoxine et certains virus-anticorps.

DAHLEN (1924) explique la rapidité de l'inactivité de la lymphe aphteuse in vitro (plus rapide à 37° qu'à 18° et surtout qu'à 0°) par la présence d'un agent vi-[illegible] réussi à séparer cet agent du virus par centrifugation. Bien que BEDSON & MAITLAND n'aient pas confirmé ce travail on peut penser à l'action d'anticorps.

Une étude intéressante de BASSET (1947) au sujet des vaccins anti-aphteux vient étayer l'hypothèse de FOGEDBY & MICHELSEN. "La disparition rapide du virus "aphteux dans les lésions est due à la phagocytose pré- "parée par l'action conjointe des anticorps généraux "et des anticorps cellulaires locaux" (antidiastases viriennes de BASSET, 1935). Le virus de culture in vivo ou in vitro serait toujours accompagné des anticorps produits au niveau des lésions dans les organes infectés. Il appuie cette hypothèse sur les travaux de FOGEDBY & MICHELSEN exposés plus haut, ceux de GREEN (1939-1946) dont le vaccin contre la maladie de Carré par passage du virus sur furet confère une résistance immédiate, mais n'est suivie d'une immunité complète qu'après plusieurs semaines (fait d'une séro-infection), et ceux de BELIN dont le vaccin a une action très rapide mais relativement brève, ce qui est le fait, d'après BASSET, de la présence d'une proportion élevée d'anti-[illegible]

D'autres hypothèses ont été émises :

WIRTH (1942) pense que le phénomène décrit par HEULE & HEULE (19[illegible]) in vivo peut expliquer qu'une inoculation forte donne une moins bonne culture qu'une inoculation plus faible : un virus inactivé ou mort inhibe sérieusement les virus vivants qui l'accompagnent. Ce phénomène pourrait jouer un rôle in vitro.

Une autre action relevée par WIRTH à ce sujet est celle d'une prolifération trop forte et trop précoce qui amène un rapide épuisement du milieu.

La constatation expérimentale faite par BRIDRE, BARDACH & RINJARD, sur la présence d'un facteur immunigène dans les tissus virulents est encore en faveur de la production rapide d'anticorps au cours des cultures de tissus. Ces auteurs démontrent l'accroissement de l'immunité anti-aphteuse par addition, à leur suspension [illegible] centrifugée, de particules formolées de tumeur virulente (culture in vivo) alors que l'addition de tissu tumoral non infecté est sans [illegible]

[illegible] en faveur de la présence d'anticorps, [illegible] encore possible de savoir "si réellement [illegible] peuvent se produire in vitro" (WIRTH, 1942

[illegible] *in vivo* et *in vitro* [illegible]

[illegible] ses virus [illegible] sur embryomes intrapéritonéaux ou sous-[illegible], et *in vitro* [illegible] de nos cultures sur liquide céphalo-[illegible]

[illegible] broyage de 4 grammes [illegible] centrifugé, [illegible] 10-7 [illegible] la méthode de BROCKSBY. Après 24 h. un aphte primaire est [illegible] au niveau [illegible] 10^{-7}, à la 31ème heure [illegible] aphte apparaît au niveau de 10^{-6} et ce n'est qu'en 48 h. [illegible] aphtes [illegible] (sur 5 [illegible]tions) à 10^{-7} et trois (sur 5) à 10^{-6}.

La virulence des virus de culture en suspensions phos[illegible] augmente par la conservation :

[illegible] FOGEDBY [illegible], [illegible] *in vitro* provoque uniquement [illegible] lésions [illegible] cobayes sur 4 inoculés, après [illegible] (1/30 pH 7,6, +4°) 3 cobayes sur 4 ont des lésions primaires importantes ; au [illegible] 2 mois, l'injection de ce virus conservé de la même façon, [illegible] des lésions primaires importantes sur deux cobayes et des [illegible] généralisé[illegible]tres. FOGEDBY & MICHELSEN rapprochent [illegible] observations de [illegible] PYL pour qui des suspensions de ly[illegible] virulente [illegible]tation du titre juste avant la [illegible] complète [illegible] phénomène tiendrait à une auto-a[illegible]vation [illegible] inconnues du contenu des aphtes. [illegible] les aute[illegible]ps de conservation permettrait à des [illegible] exercer sur les colloïdes protecteurs [illegible] de la dissociation du complexe [illegible] de particules de virus et ainsi aug[illegible]

[illegible]

[illegible]ificité des types du virus [illegible]ée, malgré des séries de cul[illegible] FRENKEL, FOGEDBY). Les pro[illegible] sont conservées qu'ils aient été, auparavant [illegible]

[illegible] FRENKEL [illegible]

... à la culture ...

la souche hollandaise

Pouvoir immunisant du virus ...

... immunité conférée par le virus ...

... née par le virus ...

... ure, après de nombreux passages, conserve ...

... une infection généralisée due au virus ...

... taux des anticorps augmente par injections ...

... ez le cobaye ...

... sont identiques (...).

Pour STRIEGLER & NAGEL l'immunité est convenable ... que si les lésions aphteuses sont seulement lo...

... vre aphteuse généralisée par le virus ...

... mises ...

... possi...

... FRENKEL ...

... dés.

... serve ses qualités primitives. Le virus d'...

... immunité ...

Conservation du virus de culture :

Avec un tampon phosphate [illegible] à pH 7,6, [illegible], le virus de culture se conserve [illegible] bien que le virus de passage [illegible]. [illegible] conservent ainsi 3 mois un virus [illegible] passage) et [illegible] 6 mois.

En solution de [illegible] le virus survit 5 semaines et même 8 semaines si [illegible] est glycériné ([illegible]). Après filtration en présence de sérum, STRIEGLER conserve la solution virulente 4 mois 1/2 à la glacière.

L'[illegible] des filtrats [illegible] diminue par une conservation de 12 semaines à 0° C. (STRIEGLER & NAGEL). Pour FORSTER [illegible] la conservation 1 à 2 mois, en milieu phosphaté, [illegible] la virulence du virus de culture.

Le virus de culture peut, aussi bien que le virus de passage _in vivo_, être conservé [illegible]. Il y aurait intérêt à extraire, par broyage, le virus des tissus de culture pour le conserver, car les produits des échanges nutritifs et respiratoires et leur acidité [illegible] pour le virus. L'utilisation aussi rapide que possible du virus de culture est souhaitable (WALDMANN).

Applications [illegible] de culture _in vitro_ :

Les applications sont les mêmes que celles du virus de culture _in vivo_. [illegible] théorique, loin d'être négligeable, est dépassé par l'intérêt pratique : l'obtention d'une grande quantité de virus en vue de la fabrication de vaccins ou de sérums [illegible].

Les recherches [illegible] à la mise au point des cultures apportent une quantité de renseignements théoriques ; toute la connaissance de [illegible] du virus aphteux s'enrichit ; on ne peut connaître les conditions de multiplication du virus sans étudier sa composition, [illegible], son mode de vie, ses besoins nutritifs et respiratoires, ses conditions de survie, de résistance aux agents physiques et chimiques...

Les cultures facilitent l'observation du virus au microscope électronique et permettront, peut-être, de suivre son évolution au sein des cellules vivantes. Mais l'objectif principal de la culture du virus reste la lutte contre la fièvre aphteuse.

[illegible] de sérum hyperimmun :

Le virus de culture [illegible] des bovins destinés à la [illegible]. Cette [illegible] est importante, puisq[illegible] en Allemagne [illegible] sur bovin et surtout sur porc, selon [illegible] plus onéreuse.

FRENKEL & [illegible] la possibilité d'hyperimmuniser des animaux producteurs de sérum anti-aphteux avec le

virus de culture d'origine bovine. Une vache, inoculée dans la muqueuse linguale par du virus de culture, ne présente qu'une infection légère, rechargée par injection intraveineuse de 30 cc. de virus A des 8ème et 9ème passages, son sérum titre 0,4 cc. et il ne paraît pas contenir d'anti-tissus. Le virus de culture est donc capable d'augmenter le taux des anticorps d'animaux n'ayant eu qu'une fièvre aphteuse inappréciable. Les porcs peuvent être solidement immunisés par des injections intraveineuses successives de virus de culture, leurs sérums titrent de 0,2 à 0,5 cc. En 1939, FRENKEL prépare 1350 litres de sérum contre les types A et O, il provoque des infections préliminaires successives par les virus de culture A et O, puis il augmente le taux des anticorps par une série d'injections intraveineuses des mêmes virus. Il maintient ce taux 5 à 6 mois en répétant les injections, tout en saignant périodiquement ses bovins. STRIEGLER (1935) hyperimmunise des bovins par du virus de culture de cobaye. Chez les bovins guéris d'une première atteinte, l'injection de virus de culture augmente le taux des anticorps ; selon WALDMANN (1937) le titre du sérum reste plus uniforme que par l'inoculation du virus prélevé sur le porc. FOGEDBY & [illegible] (1937) conseillent d'hyperimmuniser les bovins ayant subi une évolution aphteuse par une longue série de petites doses de virus de culture plutôt que par un petit nombre de fortes doses, le taux des anticorps se trouve plus élevé.

Immunisation active :

Vaccination par le virus de culture non modifié : On sait qu'en matière d'immunisation active, ce sont les virus vivants qui donnent les meilleurs résultats. L'idéal serait d'avoir un virus fixe, atténué et ayant conservé ses propriétés immunisantes comme la souche D. 17 du virus amaril. Le virus aphteux ne s'est pas prêté jusqu'à maintenant à cette atténuation. Toutefois divers essais ont été tentés par WALDMANN & KEPPIN à partir du virus de culture d'origine cobaye et par FRENKEL & VAN WAVEREN à partir du virus de culture d'origine bovine.

- Virus de culture d'origine cobaye

Les essais d'immunisation active de WALDMANN (1937) n'ont pas été très favorables. Ces virus ne possèdent qu'un faible pouvoir infectieux pour les bovins : l'inoculation par voie intradermique provoque un aphte local [illegible] [illegible]isée ; par voies sou-

[illegible]
pour provoquer une immunité protectrice contre les infections spontanées à l'étable.

[illegible] stable. Par passages uniquement sur bovins, le virus de [illegible] avec maladie localisée et immunité consécutive.

Le virus de culture type O (cobaye) récupère mal son pouvoir immunisant : 50 p. 100 des bovins infectés par la souche O, [illegible] à la contagion par le virus O d'étable, et 75 à 100 p. 100 [illegible] à partir d'aphtes formolés est évidente : 100 p. 100 des co[illegible] ainsi vaccinés restent indemnes à l'épreuve virulente (sauf [illegible] te primaire au point d'inoculation), 200 sur 300 bovins éga[illegible] tats du virus d'origine cobaye de leur culture ont engagé WA[illegible] ment quelques passages sur le cobaye. Leurs résultats sont [illegible] ture détermine une immunité solide chez 25 p. 100 des bovins. [illegible] sages sur cobayes et culture *in vitro*, une immunité plus inté[illegible] sante que celle obtenue avec le virus de culture de souches en[illegible] tenues depuis longtemps sur cobayes.

– Virus de culture d'origine bovine :

Après de tels résultats, il était logique d'utiliser du matériel d'origine bovine. FRENKEL & VAN WAVEREN (1938) ont tenté d'utiliser le virus aphteux de culture sur explantations et peau em[illegible] tion par le virus de culture avec ou sans injection simultanée de sérum de convalescents.

Séro-infection avec virus de culture : Le virus A cultivé depuis 5 ans provoque, chez le bovin, une forme légère de fièvre aphteuse, sans complications, suivie d'une solide immunité. Son titre est de 1.10^{-4} alors que celui de lymphe aphteuse bovine est souvent de 1.10^{-6}.

Dans des expériences ultérieures, FRENKEL (1939) inocule ce virus A, en passage depuis 5 ans, à 20 vaches sans provoquer aucun signe de maladie. Une 2ème injection n'a pas plus d'effet ; 14 jours après l'épreuve avec du virus A de passage sur porc prouve une solide immunité.

Le virus O, souche Groot-Amers, passe directement du boeuf en culture ; en culture, d'au moins 4 passages sur peau bovine, il conserve une virulence assez grande, son titre est de $1.10^{-[illegible]}$ pour le cobaye. L'injection de 0,2 cc. de virus de culture dans la muqueuse linguale est suivie d'une fièvre aphteuse généralisée. L'emploi du virus seul étant trop dangereux, FRENKEL & VAN WAVEREN combinent l'injection intradermique de 0,2 cc. de virus de culture au 1/10 et, sous la peau, de 150 à 500 cc. (400 cc. en moyenne) de sérum de convalescents. Des mesures hygiéniques rigoureuses sont associées à cette séro-inoculation : lavage des mains, des trayons à l'hydroxyde de sodium à 0,[illegible] p. 100 (FRENKEL), traitement des onglons par savonnage, puis tamponnement à la teinture d'iode à 10 p. 100 ([illegible], [illegible]).

Une expérience sur près de 2.000 bovins exposés à la contagion, mais jusque là indemnes, donne de bons résultats. Les bovins font une fièvre aphteuse avec élévation thermique et parfois généralisation aux onglons, mais toujours bénigne par rapport aux cas spontanés ; ni l'appétit, ni le rendement en lait ne diminuent de façon importante ; aucun cas de mortalité n'est signalé.

Aphtisation par virus de culture : La préparation de la quantité de sérum nécessaire à tout un cheptel, et l'apparition d'une fièvre aphteuse, quoique bénigne, lors de séro-inoculation, ont incité FRENKEL & VAN WAVEREN à chercher un mode d'immunisation plus simple.

Ils inoculent, par voie intradermique, à 250 bovins, le virus de culture (titrant $5.10^{-[illegible]}$ à $1.10^{-[illegible]}$) et prenant les mesures hygiéniques précédemment exposées. La plupart des animaux font une évolution aphteuse légère, avec petite diminution du rendement en lait ; la maladie, terminée en 14 jours, est bien moins sévère que chez les témoins.

Au cours du contrôle de la valeur immunisante du

vaccin obtenu [illegible] par rapport à celle du virus de culture pur non-modifié, [illegible], FRENKEL, [illegible] & VAN WAVEREN (19[illegible]) observent que l'immunisation par virus de culture seul est possible sans que les animaux présentent de lésions aphteuses. Leur virus, de type A, a plus de [illegible] passages sur peau embryonnaire bovine par la méthode de FRENKEL. Selon le lieu d'injection et la dose du virus de culture, les résultats diffèrent : chez le porc, le virus actif de 10^{-2} à 10^{-3} (titrage sur cobayes) détermine, par voie intradermique (groin et [illegible]) la fièvre aphteuse ; par voie sous-cutanée (le trajet de la piqûre à travers la peau doit être cautérisé) 1 cc. de virus est infectieux alors que 1/4 cc. provoque la fièvre aphteuse chez 4 des 17 porcs inoculés. La vaccination comporte 2 injections sous-cutanées de 1/4 cc. à 6 jours d'intervalle. Après la vaccination les anticorps n'ont pu être décelés dans le sang. Les 13 porcs restants sont éprouvés, 3 semaines environ après la dernière injection, par contact avec des porcs récemment infectés : 8 résistent à l'épreuve.

Chez [illegible] bovins le même virus A est inoculé à la dose de [illegible] par voie sous-cutanée, à 2 reprises à 6 jours d'intervalle ; [illegible] bovins sont inoculés dans les mêmes conditions, à la base de la corne, par voie intradermique. Par la suite aucun ne [illegible] de signes de fièvre aphteuse ; le titre des sérums est [illegible]. A une épreuve par contact, un mois après la 2ème vaccination, [illegible] bovins résistent ; une inoculation virulente intradermique, [illegible] jours plus tard, détermine, chez [illegible] sur [illegible], une fièvre aphteuse généralisée mais très bénigne.

Ces résultats sont encourageants mais ces méthodes ne pe[illegible] être employées que dans des milieux en imminence d'infection [illegible] le virus de culture est encore trop actif pour être appliq[illegible] la pratique courante ; de plus, il peut créer des porteurs [illegible]mes. En conclusion, FRENKEL préconise la recherche d'une [illegible] [illegible] ensuite ses propriétés constantes. [illegible] type A lui ont prouvé le bien-fondé de son hypothèse.

Utilisation du virus de culture modifié :

- Virus de culture insoluble :

Le virus de culture de FRENKEL & VAN WAVEREN se prête aussi bien que le virus de la lymphe à l'insolubilisation ; JANSSEN (19[illegible]) précipite le virus, à - 10°, par la glycérine, l'alcool et l'éth[illegible] [illegible] et contrôlés par le virus O sont immuns contre le virus A et inversement. L'immunité n'est pas durable si du sérum immun est injecté en mê[illegible]

[illegible]

[illegible] le virus [illegible] sur hydroxyde d'aluminium. [illegible] (1936) étudient les qualités du virus de culture en vue de ses possibilités d'emploi [illegible] et concluent que, pour le cobaye, le virus de culture se comporte, en principe, comme le virus naturel. Toutefois les adsorbats sont moins antigéniques que ceux préparés à partir du virus naturel, et le virus de culture doit être employé à plus forte dose pour obtenir les mêmes effets immunologiques. SCHMIDT et ses Collaborateurs immunisent les cobayes avec des adsorbats contenant de 1 à 4 p. 100 de virus qui déterminent une légère atteinte de la maladie. Ces résultats sont confirmés par [illegible] (1937) qui observe, après une semblable vaccination, la généralisation aphteuse de 7 cobayes sur 94 et l'immunisation de 70 à 100 p. 100. SCHMIDT se demande, sans pouvoir donner une réponse, si les virus de passage et de culture sont différents au point de vue qualitatif.

Les premiers essais de vaccination de bovins avec du virus de culture [illegible], auparavant par TOUSSIENG (1936) à Lindholm, ils ne sont pas très concluents, aussi bien avec le virus de culture qu'avec le virus naturel ; SCHMIDT et ses collaborateurs [illegible] bovins avec de [illegible] adsorbés. [illegible] petit nombre d'animaux d'expérience, à la faible virulence des virus [illegible] un des virus (O Riems).

Comparativement à leurs essais d'immunisation avec le virus non modifié, TOUSSIENG, FRENKEL, [illegible] & VAN [illegible]AVAREN (1938) testent l'activité d'adsorbats de virus de culture sur hydroxyde d'alumine [illegible]. L'hydroxyde d'aluminium est préparé selon les indications de HANSEN & SCHMIDT. Le vaccin se compose, pour les porcs, de 2 cc. de virus de culture (type A), 18 cc. d'Al (OH)3 et 10 cc. d'eau physiologique ; pour les vaches de 8 cc. de virus A, 8 cc. d'Al (OH)3 et 64 cc. d'eau physiologique. Il est injecté par voie sous-cutanée avec cautérisation secondaire du trajet [illegible] à la dose, chez le porc (15 animaux), [illegible] 2 fois à 6 jours d'intervalle ; chez [illegible] dose de 50 cc. suivie, 6 jours après, [illegible]. Un lot de 3 vaches reçoit 50 cc. d' [illegible] d'Al (OH)3 et [illegible] intradermique, [illegible]

à la suite des vaccinations. On constate une légère hyperthermie (non observée avec le virus de culture non modifié) et un nodule au point d'inoculation. Chez les porcs, les taux d'anticorps ne peuvent être décelés, chez les vaches, le taux est médiocre, mais supérieur à celui obtenu par l'infection dûe au virus non traité. A l'épreuve d'immunité, les résultats sont tout à fait différents chez les porcs, qui sont réceptifs (13 atteints sur 15) et chez les vaches qui sont immunisées (1 atteinte sur 9).

Dans une expérience ultérieure, les auteurs emploient un virus de type O (Groot-Amers) de 4ème passage, de titre de 8.10^{-2} et de haute virulence. 4 veaux reçoivent 40 cc. du mélange de 4 cc. de virus, 20 cc. d'Al (OH)3 et 40 cc. d'eau physiologique. Les veaux ont une fièvre aphteuse grave 48 heures après. Cette expérience a montré le danger des adsorbats peu atténués et les a fait abandonner comme matériel vaccinant.

- Virus de culture adsorbé et atténué par chauffage :

FOGEDBY (1939) cultive à Lindholm la souche Groot-Amers type O au 4ème passage sur peau d'embryon de bovin, le titre est de [illegible]$.10^{-2}$. Le vaccin est préparé par adsorption du virus sur hydroxyde d'aluminium et conservation 72 h. à 37°.

L'innocuité du vaccin est constatée sur 10 vaches. La valeur immunisante de ce vaccin est certaine puisqu'à l'épreuve d'immunité 3 vaches sur 10 ont une éruption limitée au 1/3 de la langue, les 7 autres ont un aphte au point d'inoculation ; aucune ne généralise.

Les adsorbats renfermant 80 à 90 p. 100 d'une suspension d'Al (OH)3 à 2 p. 100 et 1 à 2 p. 100 de virus de culture sont inoffensifs pour la plupart des cobayes (SCHMIDT) s'ils sont injectés par voie sous-cutanée à des doses convenables. Pour FOGEDBY & HARBO (1939), ces résultats s'appliquent aussi aux bovins. Le virus de culture se comporte vis-à-vis d'Al (OH)3 comme le virus de lymphe ; les deux virus adsorbés supportent aussi bien la température de 37° pendant 48 heures ; ils deviennent, par voie sous-cutanée, inoffensifs pour tous les animaux et déterminent une immunité dont la valeur est proche de celle de l'immunité naturelle. Cependant par voie intradermique ils peuvent être encore dangereux.

- Virus de culture adsorbé et atténué par le formol et la chaleur :

WALDMANN & KOBE (1938) utilisent le virus de culture dès les premières préparations de leur vaccin ; ce virus supporte aussi bien les manipulations que le virus de lymphe ; il peut être formolé (vaccin de Vallée, Carré et Rinjard) et adsorbé, puis chauffé (vaccin de Schmidt, Schmidt-Jensen et Hansen). Ayant subi les trois actions combinées il peut servir à faire un vaccin que WALDMANN & KÖBE ont conçu et que l'on tend à appeler actuellement le vaccin VALLÉE - SCHMIDT - WALDMANN. Sa composition est la suivante :

Hydroxyde d'aluminium à 1,3 p. 100	500 cc.
Eau distillée	300 cc.
Virus d'aphtes ou de culture à 7 p. 100 en eau distillée	35 cc.

Eau virulente de lavage des aphtes, filtres etc...	145 cc.
Solution tampon de glycine (1)	10 cc.
Eau formolée à 5 p. 100	10 cc.

pour 1 litre de vaccin

Le pH est de 9, le mélange est agité pendant 1 heure, soumis à une température de 25° pendant 48 h., puis conservé à + 4°.

Les auteurs allemands ont eu le mérite d'appliquer à la pratique bovine les importants travaux de SCHMIDT sur le cobaye. Dans leur première publication, WALDMANN & KOBE (1938) précisent que des expériences en cours, sur la durée de l'immunité, mettent en évidence une différence entre les vaccins à base de virus de culture et ceux à base de virus de lymphe.

Les résultats les plus nombreux sont donnés par HAAN & MAAS (1938-1939) : 90.000 bovins sont vaccinés avec l'un ou l'autre de 3 vaccins préparés soit avec du virus d'aphtes de bovins, soit avec du virus de culture <u>in vitro</u> sur peau embryonnaire bovine (2), soit avec un mélange, en proportions diverses, des virus d'aphtes et de culture. Les virus étaient tous du type A, celui de l'épizootie régnante au moment des expériences.

Tous les vaccins sont inoffensifs si les conditions [illegible] ; [illegible] -vres supportent les vaccins aussi bien que les bovins. [illegible] l'in-jection vaccinale, des foyers peuvent apparaître si certains animaux sont en incubation au moment de l'injection ; ces foyers sont rares (1 p. 100 des effectifs vaccinés) et le nombre des bovins vaccinés malades dans [illegible] du nombre total des bovins vaccinés.

L'immunité provoquée par le virus de culture est [illegible] virus d'aphtes ; les foyers [illegible] n'apparaissent plus après 5 jours (virus [illegible] jours (virus de culture). Le plus grand nombre des bovins est protégé contre une infection par contact 5 jours après la vaccination.

L'immunité provoquée par le vaccin à virus de mélange est plus longue à s'établir qu'avec le vaccin à virus d'aphtes, puisque des foyers consécutifs à l'injection du vaccin (virus de mélange) apparaissent jusqu'au 15ème jour

---

(1) 51 g. d'Hydroxyde de Na + 104 g. de Chlorure de Na [illegible]

(2) [illegible] de culture sur tissu bovin n'est pas exposée par les auteurs allemands.

La durée de l'immunité est moins longue avec le virus de culture, cependant elle est suffisante pour protéger pendant 3 mois des effectifs vaccinés, même contre un grave danger de contagion ; des fléchissements d'immunité sont relevés 3 ou 4 mois après la vaccination dans des effectifs fortement ou même faiblement infectés, alors qu'avec le vaccin à virus d'aphtes les fléchissements d'immunité sont insignifiants : 95 p. 100 des bovins sont protégés jusqu'au [illegible] mois. Toutefois, dans des effectifs menacés, préventivement vaccinés avec le vaccin à virus de culture, il n'apparaît pas de fièvre aphteuse pendant les 7 mois suivant la vaccination ; l'immunité est donc suffisante pour la plupart des effectifs. HAAN & MAAS ont vu des ruptures d'immunité dans 0,6 p. 100 des effectifs vaccinés, soit 26 effectifs : 9 effectifs vaccinés avec le virus d'aphtes et 17 avec le virus de culture. Pour ces dernières ruptures 7 ont été provoquées par le contact d'animaux infectés nouvellement introduits dans la même étable et 10 probablement par la circulation humaine. A l'examen des statistiques, sur [illegible] effectifs, l'immunité provoquée par le vaccin à virus de culture est encore évidente après 8 mois, mais son degré est insuffisant pour protéger la totalité des animaux : 50 p. 100 sont atteints. Dans le cas de rupture d'immunité, l'évolution de la fièvre aphteuse est très bénigne. Il n'y a pas de généralisation aux onglons ou à la mamelle, ni diminution notable de la production laitière.

En résumé, pour HAAN & MAAS, le vaccin à virus de culture donne de [illegible] résultats que celui à virus naturel : l'immunité [illegible] plus longue [illegible] à s'établir, elle n'est pas aussi régulière, elle est de durée plus courte (3 à 4 mois) et n'est pas capable de protéger contre la contagion par contact, mais seulement contre un danger d'infection générale.

En 1940, MAAS apporte de nouvelles précisions : le virus de culture confère la même protection que le virus naturel, puisque sur 46 bovins injectés avec le vaccin à virus d'aphtes, l'immunité est conservée 9 à 10 mois après chez 75 à 87 p. 100 des animaux, et sur 258 bovins injectés avec le vaccin à virus de culture, la durée d'immunité est la même pour 90 à 100 p. 100 des vaccinés.

On pouvait fonder de grandes espérances sur le vaccin à virus de culture lorsque MOHLMANN (1941) publia son rapport basé sur l'observation de [illegible] bovins vaccinés (virus naturel et de culture) dans 300.000 exploitations. Si certains effectifs ont été protégés contre l'infection par contact jusqu'à 10 mois après la vaccination, les résultats sont assez disparates ; en Prusse, 0,06 p. 100 des 25.300 étables dont les bovins ont été vaccinés avec le vaccin à virus naturel et 3,4 p. 100 des 500 étables ayant reçu le vaccin à virus de culture, sont atteintes de fièvre aphteuse. Quelques défaillances de la vaccination dûes à des variations du type de virus sur le terrain n'ont aucun rapport avec la préparation ou la composition du vaccin, elles sont exclues des pourcentages.

MOHLMANN ayant conclu que le vaccin à virus de culture n'était pas satisfaisant, la station de l'île de [illegible].

La même année BERGER (1941) a signalé à l'Office International des Epizooties les bons résultats obtenus par FRENKEL au cours d'essais avec le virus de culture adsorbé, formolé et chauffé. Ce vaccin, inoffensif, confère aux bovins une immunité absolue. Il se produit, 8 à 9 jours après l'injection vaccinale, une élévation de température allant jusqu'à 40° ; à ce moment le titre du sérum est nul, mais il atteint, au 25ème jour, un taux équivalent à celui observé après une fièvre aphteuse expérimentale.

A Lindholm, FOGEDBY & HARBO (1941) démontrent que le virus naturel ou de culture, formolé et adsorbé par l'hydroxyde d'aluminium, est capable d'engendrer une immunité de plus longue durée que le virus simplement formolé. Ils préparent un vaccin trivalent efficace. Tous leurs vaccins peuvent supporter 37° pendant 15 jours sans que leurs propriétés immunisantes disparaissent complètement.

FOGEDBY & KOEFOED (1942) pré[illegible]t plusieurs vaccins à partir de virus A et O cultivés [illegible] pulmonaire d'embryon bovin (1er passage) ou sur peau d'embryon bovin (8ème passage). Ils adsorbent leurs virus sur hydroxyde d'aluminium, les [illegible] aldéhyde formique (0.5 p. 1.000 [illegible] [illegible] à 26°). Les résultats des vaccinations de 74 vaches, par injection de vaccin dans la langue, sont très variables : quelques vaccins provoquent la maladie, d'autres [illegible] que partiellement.

Un vaccin préparé à partir d'un virus de culture dont la suspension a été débarrassée de ses sels par électrolyse (titre 1.10^{-2}) est moins actif que celui préparé avec un virus non épuré.

[illegible] ont préparé, simultanément, 2 vaccins, l'un avec un vi[illegible] culture actif à 1.10^{-5}. La vaccination sur deux lots [illegible] le pouvoir immunisant du virus de culture est équivalent

à celui du virus d'étable.

FLUCKIGER (1945) essaye de concentrer le virus de culture par hypercentrifugation, pour le rendre plus efficace,

[illegible] (1947) prépare un vaccin [illegible] avec son virus cultivé sur peau embryonnaire bovine ; ces vaccinations au laboratoire et en pratique rurale sont [illegible] et doivent faire l'objet d'une relation.

Toutes ces expériences prouvent l'intérêt de l'utilisation du virus de culture pour la préparation du vaccin ; le principe est admissible, mais les nombreux essais de vaccination de Bovin et de [illegible] à partir de vaccins de [illegible] différents, [illegible] à base de virus de culture, montrent [illegible] petit nombre [illegible] de ces vaccins est efficace. Les résultats sont encore incertains ; le vaccin à virus de culture n'est pas aussi sûr que celui à virus naturel.

Discussion : (1)

[illegible] du virus de [illegible] est possible, en particulier sur les peaux et muqueuses embryonnaires d'animaux réceptifs. C'est un des virus les plus difficiles à cultiver ; certaines souches, dans chaque type, sont plus aptes les unes que les autres.

Cette culture a réalisé de grands progrès depuis 20 ans, mais elle est à peine sortie du stade expérimental car son application est difficile.

HECKE, puis M. & H. MAITLAND ont été les premiers à cultiver le virus de la fièvre aphteuse sur tissus de cobayes, toutefois ce virus n'a pas de qualités antigéniques suffisantes pour les bovins, il est seulement capable d'augmenter l'immunité de bovins déjà guéris de fièvre aphteuse.

FRENKEL & VAN WAVEREN, les premiers, cultivent le virus aph[illegible] [illegible] les bovins. Par les méthodes de CARREL et de M. & H. MAITLAND, les quantités de virus sont insuffisantes ; par la méthode hollandaise le rendement des cultures est encore limité car il faut pratiquer un nombre considérable de cultures dans des conditions très [illegible]

Les activités pathogène et immunisante du virus cultivé sont inférieures à celles du virus naturel ; il n'est pas fixe, son

---

(1) [illegible] l'étude de la méthode de FRENKEL [illegible] les méthodes de culture [illegible] ; les méthodes modernes de culture en masse sont décrites en détail dans le chapitre [illegible] trait aux [illegible] travaux anciens qui viennent de faire l'objet de notre revue [illegible]

taux de virulence, son titre, sa contagiosité sont faibles et variables, il peut perdre, par la culture, 90 p. 100 de sa virulence. Cependant il n'a pas été [illegible] le virus gardant, en culture, ses caractéristiques spécifiques. Il permet la préparation de vaccins actifs contre la fièvre aphteuse. L'immunité provoquée par les vaccins de culture est plus lente à s'établir, elle est plus irrégulière et sa durée est inférieure à celle des vaccins faits avec du virus d'aphtes de bovins. Le vaccin de culture a moins d'efficacité.

La recherche d'un virus atténué et fixe provoquant une maladie bénigne mais suffisante pour immuniser l'animal n'a pas donné de résultats définitifs, les atténuations de la virulence et de l'action immunisante sont parallèles.

Le virus de culture, par son instabilité et ses qualités amoindries, est difficilement utilisable en pratique. Les incertitudes inhérentes aux cultures et [illegible] pas expliquées de nombreux contrôles sont encore nécessaires. Le problème industriel de la culture in vitro du virus aphteux par les méthodes exposées n'est pas résolu, toutefois le virus de culture a déjà joué un rôle dans la prophylaxie de la fièvre aphteuse : préparation industrielle de sérums immuns et de divers vaccins.

Les succès obtenus par les différents groupes de chercheurs ont démontré la possibilité d'arriver à des résultats pratiques par des travaux méthodiques, et par l'emploi de nouvelles techniques.

La culture in vitro a rendu d'incontestables services [illegible] du virus aphteux.

C'est à la lumière de ces données que FRENKEL a mis au point sa méthode de culture sur tissus adultes et que nous avons orienté nos recherches ; nous nous sommes basé, en particulier, sur la nécessité de cultiver [illegible] cellules vivantes [illegible] épithéliales embryonnaires dans des conditions générales optima.

X X

2) Les NOUVEAUX PROCEDES de CULTURE en MASSE du VIRUS APHTEUX :

Nous exposerons les méthodes de culture en masse *in vitro* : sur épithélium lingual (méthode de FRENKEL), sur foetus mis en survie expérimentale (méthode de J.-André THOMAS, J.-Pierre THIERY, Louis et Léone SALOMON), en liquide amniotique déprotéiné (méthode de J.-André THOMAS, J.-Pierre THIERY, Louis et Léone SALOMON & J.-Paul THIERY), en liquide céphalo-rachidien (méthode personnelle).

Ces procédés modernes conduisent à des cultures beaucoup plus importantes que les procédés anciens, elles doivent, dans un proche avenir, les supplanter, c'est la raison pour laquelle nous les avons groupés dans ce chapitre.

Auparavant, avant d'entrer dans l'étude des techniques, des conditions et des résultats de ces cultures du virus aphteux, nous trouvons utile de donner quelques renseignements sur les foetus et leurs rapports avec la fièvre aphteuse.

INTRODUCTION : Foetus et fièvre aphteuse :

Nous avons étudié les questions préliminaires suivantes :

- quel est le rapport entre l'âge et la taille des foetus bovins et ovins ?
- le foetus bovin peut-il être atteint de fièvre aphteuse ?
- le foetus de cobaye, ou de bovin, peut-il être immunisé contre la fièvre aphteuse ?
- pourquoi ne pas cultiver le virus aphteux sur le foetus *in utero* dans l'organisme maternel ? (expérience personnelle).

Rapport entre l'âge et la taille des foetus de bovins et d'ovins :

L'embryon est désigné sous le nom de foetus quand il prend la forme caractéristique de l'espèce à laquelle il appartient. La circulation sanguine s'effectue entre l'embryon et la vésicule ombilicale et, plus tard, entre le foetus et le placenta.

L'âge des foetus nous intéresse tant pour les travaux sur les cultures de tissus que pour ceux ayant trait aux survie foetales.

Nous avons résumé, dans le tableau suivant, les caractéristiques publiées par CURLT et reprises par LESBRE, et celles données par VAN DE PAS.

Age	BOVINS		OVINS	
	Longueur	Caractéristiques	Longueur	Caractéristiques
Fin du 1er mois	1 cm.	ébauche des membres	1 cm.	extrémités formées
2ème "	5 à 8 cm	sternum, palais et extrémités formés	[illegible] cm.	40 à 60 gr.
3ème "	14 cm.	scrotum et les 4 parties stomacales distinctes	15 cm.	peau nue
4ème "	24 cm.	sabots	24 cm.	les poils apparaissent
5ème "	35 cm.	pis. descente des testicules poils aux lèvres	30 cm.	tout le corps poilu
6ème "	46 cm.	cils		
[illegible] "	60 cm.	crins à la pointe de la queue, poils à la couronne et région des cornes		
8ème "	65 cm.	poils sur le dos et aux oreilles		
9ème "	80 à 100 cm.	tout le corps poilu		
280 à 290 jours		naissance	150 à 155 jours	naissance

La longueur est mesurée de la protubérance occipitale à la naissance de la queue.

Le foetus peut être atteint de fièvre aphteuse pendant l'infection de sa mère.

Dès 1895, MOBIUS publie 2 observations confirmées l'année suivante par BODENMULLER qui en décrit une. NOCARD & LECLAINCHE (1903) signalent la possibilité de l'infection du foetus dans les derniers jours de la gestation. Au moment de la mise bas, les veaux montrent une [illegible] de fines vésicules dans la bouche

et sur les onglons ; ils succombent quelques heures ou quelques jours après la naissance. Pour notre part, nous n'avons jamais observé de foetus porteurs de lésions de fièvre aphteuse, il est vrai que nous prenons de jeunes foetus.

Autre preuve qui nous intéresse directement, la possibilité de culture du virus aphteux *in vitro* sur peau, poumon de foetus [illegible] et de bovin. La revue précédente des nombreux travaux sur ce sujet l'a suffisamment démontrée.

La question de l'immunité du foetus est d'une importance capitale. Chez le Cobaye, LE[illegible]AYER, 1943, puis GURUEL, 1949, ont expérimentalement démontré la transmission de l'immunité de la mère aux nouveau-nés. Les mères sont immunisées activement par injection d'un vaccin formolé, aluné ou de type Vallée-Schmidt-Waldmann. Leurs recherches ont été étendues aux femelles séro-vaccinées ou même immunisées passivement. L'immunité est révélée dès le premier jour de la naissance ; elle est encore manifeste le 45ème jour chez les cobayes nés de mères immunisées activement, les cobayes témoins de même âge sont tous réceptifs à la fièvre aphteuse. Cette transmission n'a rien de surprenant puisque, comme l'indiquent LE[illegible]AYER, [illegible] GIRARD, CURVAZIER & CHEY[illegible], d'après la classification de SCHNEIDER & SZATHMARY, le cobaye appartient au groupe d'animaux à placenta à trois couches de tissus (ainsi que le lapin et la [illegible]) "l'immunité colostrale est nulle, l'immunité est uniquement placentaire".

Chez la vache, le problème est différent, le placenta (comme celui de la jument, de la truie, de la chèvre) possède sept couches de tissus "les anticorps ne traversent pas le placenta, l'immunité est "colostrale". Par cette preuve histologique, il n'y aurait pas à craindre, pour nos [illegible], l'immunisation du foetus, soit après la maladie naturelle, soit après la vaccination.

L'immunité colostrale est prouvée depuis LOEFFLER (1898) qui, inoculant de virus aphteux, 8 et 15 jours après sa naissance, le veau d'une vache hyper[illegible], ne constate aucun symptôme de fièvre aphteuse : la mère a transmis son immunité par son lait. GIRARD a, de nouveau, confirmé cette transmission (cité par BASSET, 1949).

BASSET (1949) nie la transmission placentaire des anticorps au foetus bovin, mais tous les auteurs ne sont pas d'accord. En effet, chez les vaches infectées, le foetus [illegible] de quelques mois, paraît acquérir une immunité dont le degré est d'ailleurs variable (FORSMANN & MAGNUSSON, 1942).

Pour KOBE (1941) l'immunité active, provoquée par l'injection de vaccin Vallée-Schmidt-Waldmann [illegible] être transmise de [illegible] au foetus, aussi bien que dans l'infection naturelle, il constate que 33 veaux nouveau-nés de mères [illegible], sur 41, sont immunisés pendant plusieurs mois. L'auteur pense que les anticorps du lait (immunité passive) sont insuffisants pour provoquer une solide protection pendant [illegible].

Nous avons consulté [illegible] qui a étudié expérimentalement cette question. Nous tenons à le remercier de ses conseils et de sa grande amabilité. Selon lui, le foetus de 6 mois d'un animal hyperimmunisé peut montrer quelques traces insignifiantes d'immunité, mais il n'a pas constaté d'immunité chez un animal seulement vacciné et il considère que, pratiquement, un foetus bovin de 3 mois n'est pas immunisé. Par l'affirmation de ROSE, la question n'est pas absolument tranchée et un doute subsiste quant à l'immunisation possible du foetus plus âgé. De plus, en cas d'altérations placentaires, le passage des anticorps est certain et cette éventualité n'est pas à éliminer pour nos foetus d'expériences trouvés au hasard des abatages (1).

Le taux des anticorps chez la mère immunisée, à la suite de la maladie naturelle ou après vaccination, peut être faible, surtout s'il s'est écoulé un certain temps entre l'immunisation et la mise bas. Quoiqu'il en soit, la recherche des anticorps par inoculation au Cobaye, ou par déviation du complément, ne donnerait des renseignements qu'après l'inoculation de nos cultures. Pour la même raison, la recherche des anticorps chez le foetus n'a pas été entreprise ; et, de plus, on peut craindre un pouvoir complémentaire assez élevé dans le sang foetal.

Le choix des foetus est ainsi, malgré nous, laissé un peu au hasard et peut être, naturellement, une source d'échecs des essais de culture.

La culture <u>in vivo</u> des virus et microbes sur foetus de petits mammifères dans l'organisme maternel est une méthode mise au point par AUBERT & HUDSON (1945). L'usage du foetus a de nombreux avantages : stérilité bactériologique si le placenta est intact, intérêt des cellules embryonnaires pour la culture des virus, haute susceptibilité aux injections, absence, en général, d'anticorps, selon les espèces animales.

Les inoculations doivent être faites, après anesthésie à l'éther, directement dans le foetus ou le placenta, aseptiquement et avec le minimum de traumatisme. L'utérus doit être dégagé chirurgicalement et le foetus inoculé à travers le muscle utérin et les membranes foetales. L'inoculation terminée, l'utérus est remis en place, la peau et les muscles de l'abdomen sont suturés.

---

(1) Les altérations placentaires peuvent être dues à des [illegible] qui se retrouvent dans le foetus et les liquides des enveloppes comme par exemple Br. abortus, relativement fréquent. PETEK & GAGLIARDI (1949) ont isolé une corynébactérie pathogène de l'estomac de 2 foetus.... Pour nos expériences, nous éliminons les foetus qui présentent des altérations quelconques.

d'une façon plus simple, on peut, surtout chez le cobaye, inoculer directement le foetus à travers la paroi de l'abdomen. Le foetus est prélevé après un certain temps d'incubation. La période adéquate de la gestation doit être choisie avec soin pour que l'inoculation réussisse et que le temps d'incubation soit suffisant.

Les auteurs américains emploient le lapin, le cobaye, la souris et le rat. Chez le cobaye, les foetus sont palpables vers le 30ème jour de gestation, le temps d'expérimentation peut donc être d'un mois. Dans les derniers jours de la gestation, l'avortement [illegible] est fréquent. En général, il ne se produit pas d'infections secondaires du foetus, ce qui permet de garder des virus bactériologiquement stériles au cours de nombreux passages en série.

Les foetus sont beaucoup plus sensibles aux virus que l'animal adulte : le cobaye, par exemple, l'est pour le virus de la grippe, le lapin pour celui de la vaccine. Les foetus peuvent être infectés par des voies où résiste l'adulte.

WOOLPERT & HUDSON ont produit des virus de la grippe et de la vaccine bactériologiquement stériles difficiles à obtenir sur la peau d'un adulte (vaccine) ou sur le poumon (grippe). Ils ont réussi 10 et 16 passages successifs. Le titre du virus se maintient, mais la virulence paraît s'atténuer. SMITH & THEILER ont inoculé des embryons de souris avec le virus de la fièvre jaune pour déterminer les organes les plus favorables à son développement. L'expérience leur ayant montré la grande concentration du virus dans le cerveau, ils l'ont utilisé avec succès pour leurs cultures du virus sur cultures de tissus <u>in vitro</u>.

Les recherches de WOOLPERT & HUDSON, pour la production d'anticorps grippaux chez les foetus de cobayes, sont encourageantes, le cobaye nouveau-né produit un sérum neutralisant de bon titre. Le foetus peut être activement immunisé. Plus le foetus est proche du terme, plus les réactions sont bonnes. Les anticorps de la mère sont titrés en même temps pour éliminer leur transmission maternelle.

<u>Expériences personnelles</u> :

Nous avons essayé d'inoculer le virus aphteux à des foetus de cobayes, <u>in vivo</u>. Nous avons réalisé deux modes d'infection du foetus : inoculation du virus par voie intradermique chez la mère ou inoculation directement intrafoetale. Les virus, de différents types, sont adaptés, depuis de nombreux passages, au cobaye (souches VALLÉE), ils consistent en aphtes primaires de cobayes broyés au sable, centrifugés, filtrés ou non, sur Seitz EKS et dilués de 10^{-2} à 10^{-4} en milieu tamponné. Les femelles sont choisies à différentes périodes de gestation : du 30ème au 50ème jour environ.

Nous avons inoculé les foetus à travers la paroi abdominale, après rasage et antisepsie de la peau au point de perforation.

[illegible], nous avons [illegible] le cerveau des foetus et, dans un cas, à réaliser (toutefois au hasard) une inoculation intradermique dans la peau des crânes de 2 foetus jumeaux.

Nous avons observé les femelles gravides, après inoculation de virus par voie intradermique, à l'occasion de passages de virus pour le rajeunissement des souches, le titrage de virus, de vaccin ou sérum, production de sérum hyperimmunisant en vue de la déviation du complément, identification des souches.

Le tableau 31 (p. 311) donne le détail des expériences.

En résumé, les trois types de virus aphteux (A, O, C) sont utilisés et donnent des résultats parallèles.

- inoculation de la mère par voie intradermique. Sur 16 essais, 9 femelles ont avorté. Après avortement ou sacrifice de la mère, les 23 foetus ne présentent aucune lésion spécifique de fièvre aphteuse. L'inoculation de leurs tissus, en particulier des muqueuses buccales, n'a provoqué, pour 1 foetus, qu'une infection [illegible] primaire à un cobaye et, pour un 2ème foetus, une fièvre aphteuse généralisée en 7 jours (le nombre des cobayes de titrage s'est élevé à 25).

- inoculation du foetus par voie intracérébrale : 2 essais négatifs (un avortement) ; par voies diverses : 7 essais comprenant 4 avortements et 3 sacrifices (à 48 et à 72 h.) ; les 12 foetus ne présentant pas de lésions. Le virus est retrouvé dans 2 foetus, les autres ne sont pas virulents (18 cobayes de titrage).

Conclusions : L'infection aphteuse de femelles cobayes gravides, ou l'inoculation de virus aphteux dans le foetus lui-même, est, le plus souvent, suivie d'avortement, surtout dans la période terminale de la gestation. L'avortement suit de peu la généralisation aphteuse : celle-ci est [illegible] par rapport aux témoins, chez les [illegible] pas général [illegible] survie et, à plus [illegible] être [illegible] foetus ne semble pas infecter la mère. En cas d'avortement, l'observation des foetus et le titrage du virus sont difficiles car la mère dévore, en partie, sa progéniture. Ces essais ne sont pas encourageants ; c'est pourquoi nous n'avons pas essayé la culture du virus aphteux <u>in foeto</u> chez la vache. L'intérêt pratique serait nul et la réalisation [illegible] les difficultés d'inoculations multiples sur la peau foetale, les risques d'infection bactériologique, de rupture des membranes et d'avortement.

INOCULATIONS par VOIE INTRA[illegible] chez la [illegible]

Nbre foe-tus	âge approx foetus	Type du vi-rus	Dilu-tion du virus	Temps de gé-néralisation de la mère	Temps entre l'inoculation & l'avortement (+) ou le sacrifice (-)	Lésions sur foetus	RESULTATS(*) Virulence tissus foetus (Nbre cobayes d'épreuve)
1	55 j.	0	1/100	72 h.	+ 48h.	néant	néant (2)
1	40 j.	0	1/50	48 h.	+ 72h.	"	" (2)
2	50 j.	0	1/100	48 h.	- 48h.	"	" (3)
1	30 j.	0	1/1000	72 h.	- 5 j.	"	" (1)
2	50 j.	A	1/500	72 h.	mort 72h.	"	" (2)
1	40 j.	A	1/500	48 h.	± 48h.	"	aphte urinaire (1)
3	40 j.	0	1/100	4 j.	+ 24h.	"	néant (3)
			témoin ++AB	48 h.			
1	30 j.	A	1/100	4 j.	- 5 j.	"	" (2)
2	20 j.	0	1/100	5 j.	- 5 j.	"	" (2)
1	55 j.	0	1/1000	48 h.	+ 72h.	"	1 cob. +0 1 cob. ++AB (7 j.)
2	50 j.	0	1/100	72 h.	+ 72h.	hémorragie tt. entier altéré	néant (2)
1	60 j.	0	1/100	5 j.	- 5 j. menace d'avort.	néant	" (1)
2	30 j.	0	1/50	72 h.	- 5 j.	"	" (2)
1	50 j.	0	1/100	48 h.	- 48h.	"	" (1)
1	40 j.	0	1/100	48 h.	- 48h.	hémorragie	1 cob. ++AB
1	50 j.	0	1/1000	24 h.	+ 24h.	néant	néant (1)

(suite du tableau n° 37)

INOCULATIONS INTRAPLACENTAIRES

247	[illegible]	[illegible] j.	[illegible]	1/[illegible]	pas de généralisation	+ [illegible] h.	zone hémorragique au pt d'inoc. pt. blanc sur placenta	Essai (1)
248	2	40 j.	[illegible]	1/50 intra-céréb. Témoin ++AB 48 h.	"	+ 40 h.	néant sauf pt. traum.	" (2
249	1	50 j.	[illegible]	1/50	pas de génér.	+ 12 h.	néant	" (2
250	2	48 j.	V	1/500	"	+ 48 h.	hémorr. locale	1 aphte primaire avec prél. zone hémo au pt d'inoculat. (3
251	1	40 j.	[illegible]	1/100	"	+ 48 h.	néant	++A (2
252	1	50 j.	C	1/100	"	+ 24 h.	"	néant (2
253	1	40 j.	C	1/100 intra-céréb.	"	+ 7 h.	"	" (2
254	1	50 j.	A	1/500	+0 sans génér.	+ 72 h.	"	" (2
255	2	60 j.	V	1/100 intra-dermique sur crâne	pas de génér.	+ 72 h.	"	" (2

(1) Les zones suspectes et les points d'inoculation (s'il y a des traces), les zones de prédilection, sont broyés au sable, dilués en milieu physiologique tamponné, et centrifugés. L'essai est fait sur 1 à 3 cobayes.

A) CULTURE IN VITRO du VIRUS APHTEUX sur EPITHELIUM de LANGUE ou de RUMEN de BOVIDE (Méthode FRENKEL)

Par ses nombreux travaux sur le virus aphteux le Dr. FRENKEL a été conduit à la culture en masse sur tissus adultes de Bovidés (1947). Sa nouvelle méthode permet d'obtenir, en grande quantité, un virus dont les qualités permettent de faire un vaccin ; elle est utilisée en Hollande et au Mexique sur le plan industriel.

Il s'agit d'une culture en milieu liquide aéré, composée de tissus, d'une solution nutritive et du virus. Mais les conditions habituelles de stérilité requises pour les cultures de tissus ne sont pas respectées, puisque les tissus explantés ne sont pas rigoureusement aseptiques, mais protégés seulement contre l'infection par des agents bactériostatiques ; en effet, l'infection qui peut être inapparente est inhibée par l'addition des antibiotiques, mais à la fin de leur activité, les spores et certains germes microbiens peuvent reprendre leur multiplication.

Tissus :

Epithélium de langue :

FRENKEL choisit l'épithélium de la langue bovine, c'est le tissu le plus susceptible à l'infection aphteuse naturelle et, par suite, à la culture du virus aphteux.

Les aphtes se forment au niveau du stratum spinosum situé dans les couches profondes de la muqueuse linguale. La difficulté est de les récolter stérilement, car les couches supérieures sont généralement très riches en microbes.

Préparation des langues :

Les langues doivent être fraîchement prélevées. Il n'est pas nécessaire qu'elles soient encore chaudes. La congélation doit être bannie, mais la réfrigération pendant 5, et même 9 jours, peut être tolérée (1).

Les langues sont préparées aux abattoirs sans précautions spéciales. Elles sont coupées en arrière du pharynx. Les surfaces

---

(1) En effet, le transport de l'épithélium (4 gr. de tissus pour 25 cc. de solution de Tyrode et 1.000 U.O. de Pénicilline) par avion d'Amérique en Hollande a permis à FRENKEL, DUNNE & OSTEEN (1949) une série de 12 passages de virus aphteux de type A, titre au 1er passage : 10^{-5} et au 12ème passage : 4.10^{-5}. De même par le transport d'Amérique au Danemark, FOGEDBY & JACOBSEN ont réalisé une 2ème série de passages. Cette recherche prouve la possibilité de recevoir des langues de pays indemnes de fièvre aphteuse, donc réceptives.

des langues sont nettoyées et brossées à l'eau tiède et au savon. Les langues sont placées sur des plateaux et laissées égoutter.

Prélèvement de l'épithélium :

La première technique imaginée par FRENKEL est lente, mais elle dispense de tout appareillage coûteux, c'est une méthode de laboratoire.

La pointe de la langue est immergée dans de l'eau à 80° pendant une minute. Ce bain décolle la partie supérieure de la muqueuse, des plans sous-jacents. A la pointe de la langue, la muqueuse est incisée et isolée sur quelques centimètres. La langue est suspendue par sa pointe dénudée ; les incisions latérales faites pour isoler la muqueuse sont prolongées, des deux côtés de la langue, jusqu'au bourrelet. A ce moment, la langue est brossée à l'alcool à 70° ; on laisse évaporer l'alcool sans essuyer.

Le lambeau de muqueuse détaché est saisi dans l'appareil de FRENKEL : 2 tiges métalliques à crampons emprisonnant la muqueuse et sur lesquelles celle-ci est enroulée. La séparation se fait au niveau du stratum spinosum ; la partie supérieure enroulée sur l'appareil est éliminée. La surface de la partie profonde de la muqueuse est stérile et adhérente à la langue, elle consiste surtout en cellules du stratum germinativum et quelques couches de cellules du stratum spinosum : cette partie profonde est enlevée à l'aide d'un couteau à cataracte, en évitant le tissus musculaire qui rendrait rapidement acide le milieu nutritif.

Les lambeaux de tissus sont placés en liquide de Tyrode et coupés, aux ciseaux en fragments fins. FRENKEL ajoute une petite quantité de pénicilline en solution au 1/5.000 et de streptomycine en solution au 1/50.000, ou de chloromycétine (15 mg. par litre), pour éviter l'infection, sans altérer les cellules.

Une deuxième technique de prélèvement permet une récolte de l'épithélium sur le plan industriel (1). La langue est tendue sur un cylindre spécial à l'aide d'érignes. Elle est nettoyée, brossée, passée à l'alcool comme précédemment.

---

(1) Publications du Dr. FRENKEL (1949, 1950 et 1951) et communication orale du Dr. FRENKEL (Juillet 1950) que nous tenons à remercier particulièrement pour l'amabilité avec laquelle il nous a exposé ses techniques, fait visiter son laboratoire et donné les explications désirables.

Le prélèvement des copeaux d'épithélium est très rapide : la surface de la langue est présentée devant un couteau rotatif de Berkel (modèle P. 14) (appareil à découper en tranches fines le jambon ou le poisson) préalablement stérilisé à l'alcool à 70°. Une projection de liquide de Tyrode stérile, sur les couteaux, facilite le découpage.

La première couche cornée est éliminée ; les lambeaux des plans profonds sont recueillis, dans un bocal, en solution de Tyrode, ils ont, environ, 50µ d'épaisseur.

Le morcellement de ces lambeaux s'effectue dans le même bocal placé dans l'appareil rotatif de FRENKEL, de BOET et LOKKER : des ciseaux spéciaux, mus par un mouvement rapide automatique, plongent dans le bocal ; en 10 m. la division du tissu est effectuée. La taille des fragments ainsi obtenus est certainement irrégulière, elle peut dépasser, pour certains, quelques mm^3, or il est prouvé, en culture de tissus, qu'au-dessus d'une certaine taille, les fragments tissulaires présentent toujours une zone dégénérative centrale, quelle que soit l'aération du milieu de culture ; l'épithélium adulte y est encore plus sujet que l'épithélium embryonnaire.

Epithélium de rumen :

FRENKEL & FREDERIKS utilisent des explantations d'épithélium du rumen des bovins, dans les mêmes conditions que l'épithélium lingual. La muqueuse du rumen est soigneusement lavée par une solution saline chaude, puis traitée par la pénicilline et la streptomycine.

Il semble que tous les types d'épithélium du rumen ne soient pas convenables à la culture. Chez l'animal vivant, les lésions aphteuses apparaissent au niveau de l'épithélium lisse situé autour des piliers charnus du rumen, cette partie de la muqueuse est prélevée par FRENKEL & FREDERIKS pour leurs cultures, celles-ci sont conduites comme pour l'épithélium de la langue.

Inoculation du tissu :

Que le tissu soit préparé d'une façon ou d'une autre, la suspension de fragments en liquide de Tyrode est mélangée avec une solution de virus aphteux de culture (conservé à +4°, et non congelé).

Les proportions sont les suivantes : 15 cc. de suspension de virus (à 1/2 en solution phosphatée : PO_4HNa_2 et PO_4H_2Na, de pH 7,6) pour 4 gr. de tissus, avec 5 gouttes d'une solution de pénicilline (100.000 U.O. dans 20 cc. d'eau) et 5 gouttes d'une solution de streptomycine (1 gr. pour 20 cc. d'eau).

Ce mélange peut être mis en culture immédiatement ou conservé une nuit au réfrigérateur à + 4°.

Milieu nutritif : FRENKEL emploie le milieu de BAKER dont voici la formule :

Peptone de witte	675 mg.
Cystéine chlorhydrique	9 mg.
Hémine	0,0036 mg.
Insuline	0,09 u.
Thyroxine	0,0009 mg.
Glucose	100 mg.
Sérum homologue au tissu	10 cc.
Vitamine A (contenant un peu de vitamine D)	1.000.000 u.
Acide ascorbique cristallisé	0,25 mg.
Glutathion	1 mg.
Rouge de phénol (indicateur de pH)	5 mg.
ClNa	720 mg.
ClK	18 mg.
Cl_2Ca	18 mg.
Cl_2Mg 6 H_2O	9 mg.
PO_4H_2Na 2 H_2O	4,50 mg.
CO_3HNa	100 mg.
Eau distillée	100 cc.

FRENKEL & DUNNE (1949) modifient ce milieu en remplaçant l'eau distillée par de l'eau tridistillée et en ajoutant, pour 100 cc. de milieu de BAKER, 3,2 cc. de tampon phosphaté (PO_4H_2Na 2 H_2O 2,6 gr.
PO_4HNa_2 12 H_2O 36 gr.
Eau 1.092 cc.)
0,03 gr. de sulfate de dihydrostreptomycine et 20.000 U.O. de pénicilline G, c'est leur solution I. Ils enrichissent le milieu par l'addition d'acides aminés et vitamines et obtiennent de meilleures cultures. Voici la composition de leur solution II :

Acide nicotinique	0,001	gr. par litre
Acide pantothénique	0,0002	"
Riboflavine	0,00012	"
Thiamine	0,00012	"
Pyridoxine	0,00006	"
Arginine	0,05	"
Lysine	0,18	"

Dans le cas d'emploi de cette solution, la peptone du milieu de base (solution I) est réduite à 0,3 gr

La stérilisation se fait par filtration sur disque Seitz.

[illegible], [illegible]E, EICHHORN & CAMARGO (1951) remplacent le sérum normal du milieu de BAKER par du sérum de boeuf ultrafiltré : 20 p. 100 suffisent et rendent inutile l'addition de la solution de vitamines et d'acides aminés

La culture en milieu ultrafiltré sera étudiée en détail [illegible].

Le milieu de culture de FRENKEL, même celui de base, est complexe et cher. Ses produits sont nombreux et de préparation compliquée. La préparation du milieu demande un temps assez long, même si les solutions sont préparées à l'avance et stockées. A l'échelle industrielle, ces objections sont à considérer, d'autant plus que la complexité peut entraîner des erreurs de fabrication, même si elle est standardisée ; ces erreurs involontaires peuvent être fréquentes et augmentent le prix de revient du virus. Quant à la préparation du sérum ultrafiltré elle est très chère et exige des appareils spéciaux, sur le plan industriel, elle se fait à petite échelle, dans des laboratoires spécialisés et, de ce fait, l'usage du sérum ultrafiltré est limité.

Mise en culture :

Les cultures peuvent être faites en milieu solide, selon les techniques classiques en boites de Pétri ou en flacons. Mais FRENKEL préfère les cultures liquides aérées. Il utilise plusieurs méthodes pour l'aération : l'appareil de LINDBERGH, un appareil qu'il a conçu lui-même (p. 261) et qu'il a amélioré en plaçant, au fond du récipient, un filtre de verre.

Le mélange : fragments de tissus (4 gr.) et virus (15 cc.) est mis dans une petite cuve cylindrique en verre placée sur le filtre de l'appareil à aération, et 125 à 150 cc. de liquide de baker sont ajoutés. Après fermeture du récipient, un courant de carbogène (95 p. 100 d'O_2 et 5 p. 100 de CO_2) traverse le filtre en verre et va aérer la culture. L'écume qui peut se former est arrêtée, en partie supérieure, par un autre filtre en verre, mais un réglage fin de l'arrivée du gaz évite, généralement, la formation d'écume. Plus simplement, FRENKEL fait arriver le gaz par une bougie Chamberland immergée dans un flacon d'Erlenmeyer à large goulot. Un 2ème tube, bouché au coton, permet l'évacuation du gaz ; la stérilité est assurée par des joints de vaseline-caoutchouc.

Pour les préparations en grandes quantités, FRENKEL cultive dans des cuves en acier inoxydable de 61 litres. L'axe du couvercle laisse passer un agitateur creux mobile, muni d'une bougie Chamberland à son extrémité inférieure. Le carbogène arrive par le canal de l'agitateur. Le remplissage de la cuve stérile se fait par aspiration du vide. FRENKEL met 30 litres de milieu dans chaque cuve.

Incubation des cultures

Les flacons, ou les cuves, sont placés à 37° dans une chambre-étuve. L'agitateur, relié à un moteur électrique, tourne pendant toute la durée de la culture. Le tube à carbogène amène le gaz à basse pression par l'agitateur et sa bougie.

L'incubation est maintenue de 16 à 24 h. La culture dégage alors une odeur particulière agréable si elle n'est pas polluée.

Les repiquages sont généralement effectués toutes les semaines.

Extraction du virus :

Au laboratoire, le tissu est séparé du liquide par centrifugation, puis il est broyé au quartz dans un mortier ; il est remis en suspension dans le milieu qui a servi à sa culture ; la partie liquide peut être filtrée sur disque Seitz.

Industriellement, les cultures sont filtrées sur gaze : le résidu solide des cultures est passé dans un broyeur à amandes, celui-ci est composé de 2 cylindres très rapprochés tournant à vitesses différentes et animés d'un mouvement transversal.

La pulpe et le liquide sont remis en présence dans les cuves de culture et agités une demi-heure. L'ensemble est centrifugé, filtré sur disque EKS Seitz et conservé à + 2° pendant une semaine, en attendant son contrôle, ou la fabrication du vaccin. La congélation n'est pas recommandée, car le substratum s'altère et devient acide, les sels se précipitent.

Les virus de culture sont titrés par injections intradermiques dans la langue, selon la méthode de HENDERSON. Etant donnée l'origine des tissus, la filtration, en vue de la stérilisation, est nécessaire, la quantité de formol dans le vaccin est insuffisante. Cette filtration, avec ses difficultés et les pertes de virus qu'elle entraîne, est un des inconvénients de la technique.

Résultats :

Tissus :

La multiplication des cellules n'est pas importante, mais leur survie est suffisante pour permettre une culture de virus satisfaisante. Les modifications histologiques des explants en culture, provoquées par le virus aphteux, ont été particulièrement étudiées par FRENKEL (1949) *in vivo*, il est difficile de déterminer la partie de la lésion due à l'action du virus et celle due à la réaction de l'animal. Comme nous l'avons vu précédemment, les aphtes débutent dans le corps muqueux de Malpighi (*stratum spinosum*), à ce moment les cellules de la couche génératrice (*stratum germinativum*) n'offrent pas de lésions. L'inflammation et l'exsudat sont à l'origine de la formation des aphtes, mais ils peuvent être d'origine circulatoire.

GALLOWAY & NICOLAU (1928) ont décrit les premières lésions du corps de Malpighi infecté par le virus aphteux

[illegible] les cellules s'[illegible] [illegible] que les autres, [illegible] [illegible]. Les cellules de la couche [illegible] [illegible] et ne semblent pas participer à la [illegible] du virus, contrairement aux cellules du corps de Malpighi dont la [illegible] semble lui convenir. Les vésicules se forment secondairement par réaction vasculaire ; l'exsudat [illegible] dans les espaces intercellulaires et les dilate. FRENKEL a [illegible] à déterminer la part de l'organisme et du virus dans la formation des premières lésions, par ses cultures de tissus. L'examen histologique des explants infectés est fait après un nombre d'heures variable d'incubation ; des cultures d'explants sans virus servent de témoins. Chez ces derniers, il n'y a pas d'altération de la structure de la muqueuse, alors que FRENKEL retrouve des [illegible] de vésicules aphteuses dans les cultures infectées.

Au niveau du corps de Malpighi, le cytoplasme est plus [illegible] et plus [illegible], le noyau est [illegible] et fragmenté. Les cellules s'éloignent les unes des autres comme dans les lésions in vivo ; le protoplasme [illegible] est lysé et les cellules se [illegible] et forment des foyers [illegible] ; dans ceux-ci un ferment protéolytique doit détruire la cohérence des cellules et provoquer leur disparition partielle ou totale. Il reste un amas de protoplasme et de noyaux ressemblant à des cellules géantes.

Dans un stade ultérieur, l'élévation des cellules [illegible] [illegible]. Les cellules de la couche [illegible] proches du corps de Malpighi peuvent, dans certains cas, [illegible]. FRENKEL [illegible] ni glycogène en quantité anormale, ni [illegible] spécifiques dans les cellules. Les altérations cellulaires [illegible] à apparaître à la [illegible] heure, elles sont évidentes à la [illegible] et [illegible] de la [illegible] à la [illegible]. Il s'agit de lésions [illegible] observées in vivo, mais sans formation de [illegible], ni apparition de leucocytes. Les lésions sont donc bien dues à l'action du virus, [illegible] est [illegible]. [illegible] intéressants, ils [illegible] [illegible] [illegible] en [illegible] pour ces lésions aphteuses.

FRENKEL pense pouvoir identifier les types de virus par ses cultures sur des explants d'épithélium en présence de [illegible] types [illegible]. [illegible] de lésions dans une des trois cultures [illegible] permettrait l'identification.

[illegible]

[illegible] sur [illegible]thélium lingual ?

[illegible] [illegible] Depuis, avec le type [illegible]

A, il a réalisé plus de 200 passages en série, et plus de 150 avec le type C. Les souches ne changent ni de type, ni de virulence au cours des passages.

Le titre est de 1.10^{-3} à 1.10^{-4} sur Cobaye, et de 1.10^{-5} à 1.10^{-6} sur Bovin. Dans des cultures ultérieures, FRENKEL obtient des taux de 2.10^{-6} et 1.10^{-7}.

Ce titre, bien que suffisant, n'est pas aussi élevé que celui du virus récolté sur langue bovine infectée <u>in vivo</u>, FRENKEL pense améliorer son virus, par certaines modifications du milieu nutritif, par exemple.

Au point de vue rendement, une langue adulte donne une récolte de 6 gr. environ de lambeaux épithéliaux, soit 250 à 300 cc. de solution virulente en moyenne. 4 langues peuvent être préparées par un homme en une heure, soit 100 langues en 6 h. par 4 hommes. Dans les récipients en acier, les récoltes sont de 20 à 30 l., les cultures donnent régulièrement de bons résultats.

Le vaccin du type Vallée-Schmidt-Waldmann préparé avec le virus de culture donne une bonne protection contre une épreuve sévère par l'inoculation intradermique et par le contact de 7 jours avec des bovins infectés. La quantité de virus introduite dans le vaccin, généralement plus élevée que celle des vaccins classiques, est proportionnelle au titre de la récolte, elle peut atteindre 5,5 gr. d'épithélium pour 100 cc. de vaccin.

Au laboratoire le vaccin est aussi efficace que celui préparé avec le virus d'aphtes.

cultivé sur épithélium de rumen :

Dans une première série, FRENKEL & FREDERIKS cultivent le virus aphteux au cours de 28 passages successifs. Les passages suivants sont négatifs, pour une raison inexpliquée. Dans une série ultérieure, ils font 8 passages et les 2 dernières cultures ont des titres, sur bovin, de 1/279.000 et 1/450.000. Le dernier passage est une culture de 2 litres correspondant à 150 gr. de tissu épithélial, quantité fournie, en moyenne, par 2 rumens.

Les auteurs admettent qu'une langue de bovin infectée in vivo peut fournir 50 gr. d'un virus actif à 1/2.500.000, ils calculent qu'un rumen donne 1 litre de virus à 1/450.000 ou, environ, 200 cc. avec un titre de 1/2.000.000 (ce qui correspond à la quantité de 4 langues de bovins infectés <u>in vivo</u>). Cette concordance mathématique est évidemment théorique ; il n'est pas certain qu'elle corresponde à la réalité.

Conclusions :

La méthode de FRENKEL, culture de virus aphteux sur épithélium de bovin adulte, est un progrès certain ; sa conception intelligente est le fruit de patientes recherches. Cette méthode a une grande valeur pratique pouvant être appliquée à l'échelle industrielle. Elle a l'avantage de produire économiquement une quantité importante de virus, sans recourir à un grand nombre d'animaux vivants, source de multiples servitudes. Le danger de contagion est évité, tout en dispensant de l'édification et de l'entretien de laboratoires isolés extrêmement coûteux. L'économie réalisée par la production de virus se retrouve dans la production du vaccin.

La méthode de préparation du vaccin est simplifiée et l'abaissement du coût du vaccin permet une plus large diffusion de la vaccination. La preuve de la valeur du virus de culture est fournie par le résultat des vaccinations qui, en Hollande, en ces dernières années, ont toutes été pratiquées à l'aide du vaccin préparé par cette méthode.

Les langues ne sont pas perdues pour l'alimentation, elles sont à peine dépréciées commercialement. Les abattoirs des grandes villes en fournissent un nombre considérable, beaucoup plus régulièrement, dit FRENKEL, que les embryons. L'hypothèse de difficultés dues à l'emploi de langues de bovins immunisés est réfutée par FRENKEL. Il élabore la formation d'aphtes primaires, lors de réinoculations de bovins immunisés. L'immunité locale est rompue et l'épithélium permet la culture in vivo dans presque tous les cas.

Un des inconvénients de la culture est le titre bas du virus obtenu (CAMARGO, 1951). FRENKEL recommande de titrer chaque production avant les préparations de vaccin, puisqu'il calcule d'après le titre de la culture, la dose de virus à introduire dans le vaccin. Ce calcul est, toutefois, sujet à caution, l'activité pathogène suit des lois biologiques complexes déjouant vraisemblablement les raisonnements mathématiques élémentaires, il n'est pas certain qu'une forte dose d'un virus de faible titre, équivaut, en particulier comme pouvoir immunisant, à une faible dose d'un virus de haut titre!

Naturellement cette culture de FRENKEL peut présenter, dans l'avenir, les inconvénients généraux des cultures in vitro : possibilité de mutations du virus (en culture in vitro les virus y sont toujours plus sujets qu'en milieu naturel), d'abaissement du titre et de la virulence....

Les autres inconvénients ont surtout trait à la stérilité seulement apparente de la culture et à l'obligation de la filtration, elle-même difficile comme toute filtration sur disque Seitz. L'asepsie stricte n'est pas résolue, comme le requièrent les cultures de tissus. Le gros volume de certains fragments tissulaires peut entraîner des zones de nécrose inaptes à la culture du virus. L'aération est nécessaire.

Le plus grand obstacle, surtout du point de vue industriel, à la méthode CHANG est certainement le temps de préparation et le prix de revient du milieu; c'est un milieu cher par rapport à ceux que nous avons employés dans nos cultures en liquide déprotéiné ou organique.

Le procédé en soi est plein d'intérêt, mais ses sources sont limitées.

Les critiques que nous venons d'exposer n'ont pas pour but de diminuer la portée de la découverte de CHANG, mais seulement d'en dégager, objectivement, les inconvénients dont certains se retrouvent également dans nos propres cultures.

[illegible] André THOM [illegible]
[illegible] SALOMON

[illegible] recherches préliminaires ent[illegible] Louis et Léone SALO[illegible]

[illegible] de [illegible] principalement de bovin[illegible] [illegible]lées puis, dans un 2ème, ces foetus en survie ont serv[illegible] [illegible]lture vivant. Finalement une méthode codifi[illegible] [illegible]t simple a été mise au point par l'équipe [illegible] maintenant appliquée et renouvelée [illegible] tout expérimentateur spécial[illegible]

[illegible] permettent la perfusion physiologique pro[illegible] de [illegible] organes ou d'organismes entiers

[illegible]

[illegible] PERFUSION DES [illegible]
[illegible]ERS :

[illegible]

[illegible]

[illegible] r les [illegible] que l'[illegible]

[illegible] pouvons [illegible] de perfusion et des [illegible] nous rappellerons [illegible] Journal de Phys[illegible]

[illegible] la plupart des difficultés jusqu'ici [illegible] mousse, [illegible] en congestion continue.

[illegible]

[illegible] par [illegible]

[illegible]

anatomiquement à la base du coeur. Le poumon-réservoir artificiel ou oxygénateur est un cylindre contenant des disques et du sable sur lesquels le sang s'oxygène.

J.-André THOMAS vient de mettre au point, avec BEAUDOIN, le type définitif du coeur-poumon artificiel dont on trouvera la description et le mode de fonctionnement dans le Journal de Physiologie (1951, 43, 311-327). Cet appareil est destiné à la perfusion aseptique du sang du corps humain entier, par exemple en vue de l'exclusion opératoire du coeur avec assèchement de ses cavités. Le principe de cet appareil est très différent de celui des appareils qui existent à l'étranger. Il est le résultat des recherches très longues et minutieuses consacrées, par J.-André THOMAS, à l'étude du coeur-poumon artificiel, recherches qui l'ont amené à adopter les solutions nouvelles ayant trait à l'hémodynamique, l'hémostase, la filtration du sang, la stérilisation, (Congrès de Chirurgie, Paris 1951).

Hémodynamique : L'onde artérielle pulsatile est reproduite selon ses caractéristiques physiologiques, elle est réglable en cours de marche, de même que la dépression veineuse. Un des principes les plus importants qui président au fonctionnement de l'appareil est celui de la systole à pression constante, quelles que soient les variations du débit ; à la systole, le coeur (naturel ou artificiel) lance le sang sous une pression constante, si une artère est pincée, le débit devient nul et, en amont de la pince, la pression n'augmente pas ; l'appareil assure un débit toujours au maximum de ce qu'il peut être, selon la résistance de chaque voie offerte au sang. La pression est seule invariable au niveau choisi. L'artère pulsante de l'appareil peut ainsi être pincée sans dérégler ou arrêter le coeur artificiel.

Une auto-régulation artério-veineuse, par un système à flotteur indéréglable, permet à l'appareil de ne pas injecter plus de sang qu'il n'en reçoit : l'organisme perfusé ne peut pas être [illegible]

[illegible] THOMAS & BEAUDOIN ([illegible]) ont [illegible], pour [illegible] principe du brassage-[illegible] sous tube. [illegible] appareil, le sang est [illegible] par de [illegible] [illegible]

Le barbotage a lieu à l'arrivée du mélange sang et oxygène dans le réservoir de l'appareil, il se forme de la mousse de sang plus ou moins abondante. Le démoussage pneumatique est réalisé convenablement par des jets alternatifs et touchants d'oxygène. L'hématose est satisfaisante et il n'y a pas à craindre d'hémolyse, de dénaturation, d'acidose du sang, comme le prouvent les mesures de pH, d'absorption d'oxygène par le sang et les dosages d'hémoglobine libérée par hémolyse dans le plasma. Les quelques déformations des hématies sont peu graves et sont réversibles.

[illegible] vent se trouver dans le sang. Il ne doit pas se colmater. Le filtre tubulaire de l'appareil est en nylon et a une surface renouvelable en cours de marche ; par une commande étanche il suffit de tourner la bobine sur laquelle s'enroule la région déjà utilisée, pour décolmater le filtre.

Stérilisation : L'appareil peut être nettoyé et stérilisé comme tout instrument de chirurgie. Il peut être préparé à l'avance. La partie physiologique de l'appareil se stérilise d'un seul bloc au four à 160°. L'asepsie est parfaite sans emploi d'antiseptique.

[illegible] Usage et manoeuvre : le bloc physiologique [illegible] sous un carter de plexiglas repose sur un statif mécanique. Les régulations artério-veineuses et [illegible] est éliminé avec l'excès d'oxygène du circuit. La manoeuvre est simple, elle s'effectue par des boutons qui règlent la vitesse du coeur, la pression artérielle, la dépression veineuse, le démoussage pneumatique. Les manipulations en cours d'expérience : prises de sang, introduction de substances ou de sang nouveau, brusque rentrée d'air pour effondrer la dépression veineuse, la vidange.... s'effectuent sans difficulté.

La quantité de sang nécessaire au fonctionnement [illegible] du circuit extra-corporel varie selon les [illegible] et de diamètre intérieur de 18 mm., on doit utiliser environ 1.300 cc. de sang ; le débit de sang [illegible], dans ce cas, peut atteindre près de 7 litres par minute, à la fréquence de 80 pulsations par minute. La pression artérielle au maximum peut atteindre 2 cm. Hg. La pulsation est sensiblement physiologique.

Les chiffres se rapportant à l'étalonnage physiologique de l'appareil avec du sang hépariné montrent que le taux de fixation de l'oxygène par le sang est très élevé, alors que le taux d'hémolyse traumatique est très faible, à fort débit tout en respectant les caractéristiques de l'hémodynamique, dans des conditions de stérilité parfaite.

En résumé, l'intérêt de cet appareil [illegible] de l'aorte humaine est de réduire au minimum l'altération du sang, tout en permettant des pressions artérielles maximum et minimum, réglables indépendamment, et constantes, [illegible] les variations de débit. Il permet de provoquer, à des rythmes divers, une ondée pulsatile physiologique, de disposer d'une dépression veineuse réglable, d'une autorégulation artérielle et veineuse, et d'un thermostat. Enfin il est de volume réduit et stérilisable.

c) Procédé expérimental de la survie aseptique [illegible] organes et organismes :

Un ensemble de procédés techniques de perfusion relativement simplifié mis au point par J.-André THOMAS, lui permet de mettre en survie, stérilement, les organes animaux & humains prélevés en milieu septique, même ceux des animaux de boucherie prélevés aux abattoirs.

Prélèvement, transport et péparation des organes

Il est fait appel, à la fois à l'asepsie et à l'antisepsie, selon la méthode de J.-André THOMAS, pour la survie des organes non stériles (J.-André THOMAS, [illegible] J.-André THOMAS & [illegible], 1947 et 1948). [illegible]

Après l'abatage, dès l'ouverture de l'animal, l'organe est prélevé rapidement, des pinces de Kocher sont posées sur l'artère principale ou, mieux, si possible, sur le gros tronc, de chaque côté de l'origine de l'artère de l'organe.

L'opération est pratiquée aussi stérilement que possible avec gants et instruments préparés à l'avance, mais en milieu partiellement septique.

L'organe libéré est posé sur un plateau et immédiatement recouvert d'une feuille de cellophane stérile. Il est alors soumis à un lavage préliminaire de ses vaisseaux pour en chasser le fibrinogène. A l'aide d'une seringue [illegible] le liquide tamponné de J.-André THOMAS [illegible], par l'artère principale, au fur et à mesure [illegible] les artères collatérales qui coulent sont pincées.

[illegible]

cosine (5-sulfanilamido-[illegible]-diméthyl-pyrimidine) et de pénicilline G (20.000 U/[illegible] par litre). Le tout est contenu dans une grande conserve étanche et maintenu à 38°, environ, par une étuve portative du type décrit plus loin, ou dans une large bouteille thermos. Le transport au laboratoire se fait, rapidement, en automobile.

La préparation définitive de l'organe commence aussitôt, en salle d'opération aseptique, dont l'air a été filtré après pulvérisation d'eau sous pression.

Une canule métallique prolongée par un tuyau de caoutchouc est liée à l'artère principale. Cette tubulure sert d'abord au lent lavage définitif, puis à la perfusion proprement dite. Le liquide de lavage peut être le liquide tamponné pur ou additionné de polyvinyl-pyrrolidone (subtosan) déjà cité ou, mieux, le sérum sanguin homologue pur. Les solutions anticoagulantes (citrate ou oxalate) sont nocives.

J.-André THOMAS a imaginé un flacon laveur, à vaisseaux, muni d'une poire de caoutchouc et d'un manomètre pour pratiquer, lentement et sous basse pression, [illegible] le lavage [illegible]. Une trop forte pression [illegible] l'organe [illegible] pendant ce lavage, [illegible] est "[illegible]" [illegible] les artères collatérales liées sans manœuvres brutales.

Le lavage terminé, l'organe est décoloré ; le tuyau de caoutchouc de la canule est fermé par une pince de [illegible], puis coupé [illegible] de cette pince. Le reste du tuyau de caoutchouc, toujours sous pression du liquide de lavage [illegible] des doigts, sert à brancher l'organe sur la partie interne de la tétine artérielle de l'appareil, elle-même remplie de sang.

Aussitôt ce branchement terminé, l'appareil est mis en marche, l'organe est perfusé dès ce moment. Si le liquide de perfusion est du sang, l'organe reprend [illegible]. La surveillance consiste à vérifier, de temps en temps, la pression différentielle et le pH du milieu mesuré sur des prises à l'électrode de verre. Si le sang ne produit pas de mousse, l'organe ne présente pas d'œdème, même tardif, s'il est immergé dans un bain de sang artériel. Les prélèvements et les ensemencements bactériologiques prouvent que la stérilité se maintient au moins 4 jours.

Eléments du milieu de perfusion :

Le sang, ou le sérum homologue à l'organe perfusé, est le milieu idéal pour la perfusion des organes, il y a intérêt à le diluer par une solution saline afin de l'enrichir et de le stabiliser pour les expériences prolongées.

Toutes les formules proposées ont pour but de remplacer le [illegible] animal et son [illegible] ont étudié une gamme de solutions physiologiques, depuis celles relativement simples, comme le liquide de Tyrode, jusqu'à des milieux très complexes, comme ceux de [illegible]. VAN SLYKE et [illegible] (1939), puis [illegible] (1942) ont également proposé diverses formules. Le liquide de J.-André THOMAS est spécialement étudié pour les travaux de survie. Il a été décrit précédemment (p. [illegible]).

J.-André THOMAS a mis au point la préparation de plusieurs litres de sang défibriné ou hépariné.

Sang défibriné :

Les anticoagulants [illegible] doivent être rejetés comme toxiques. La défibrination à l'aide de billes de verre dans un flacon est avantageusement remplacée par un appareil de J.-André THOMAS qui défibrine le sang et peut aussi préparer le sérum.

Le sang est prélevé à la jugulaire d'un bovin par un trocart à siphon latéral et conduit, par un tuyau de caoutchouc, à la tétine d'arrivée du sang, sur le couvercle de l'appareil. L'air sort à travers une boule à coton. Le couvercle ferme l'ouverture d'un gand tube de verre de 3 litres, il est maintenu par 3 griffes, un joint de silastic assure l'étanchéité. A l'intérieur un axe [illegible] est entraîné par un moteur à l'aide d'une transmission flexible. Toutes les pièces métalliques sont en acier inoxydable. [illegible] assure l'asepsie de l'appareil.

Le sang défibriné stérile est recueilli par un ajutage garnissant un goulot situé à la partie inférieure du tube. Il est ensuite filtré aseptiquement sur quelques couches de gaze.

Sang hépariné :

Le sang est prélevé sur l'animal qui va fournir l'organe. Les animaux de laboratoire reçoivent une injection intraveineuse d'héparine quelques minutes avant la saignée.

Le sang des animaux de boucherie est reçu dans un grand flacon contenant l'héparine et dont toutes les tubulures ont été lavées à la solution héparinée. La jugulaire, ou la carotide, est ponctionnée aussitôt après l'abattage et l'ouverture du cou, la pression sanguine est encore suffisante. Plusieurs litres de sang peuvent être ainsi recueillis sur la vache et se garder sans caillot.

Le sang conservé citraté (par tampon de citrate trisodique - acide citrique) n'est pas recommandé pour la perfusion ; il peut coaguler en partie, être relativement toxique et difficile à ajuster à un pH déterminé.

Sérum :

Le flacon à défibriner se transforme facilement en flacon à

sérum en retirant l'armature métallique interne. Une masse trouée est accrochée à 2 anneaux placés dans les 2 tétines du couvercle. Après coagulation, les ficelles qui suspendent la masse sont flambées et celle-ci tombe sur le caillot. 24 à 48 h. après le sérum est aspiré par l'ouverture centrale du couvercle.

Extraits organiques :

Les extraits d'organes foetaux (thymus, rate, coeur, par exemple) que l'on ajoute, éventuellement, aux liquides de perfusion sont préparés par broyage des organes, soit à l'appareil de Latapie, soit, mieux, à grande vitesse, au froid, dans un appareil Turmix dont le réservoir, modifié par J.-André THOMAS, comporte un manchon réfrigérant en acier inoxydable. Le broyage, dilué en solution saline, est centrifugé ; le liquide surnageant est, seul, utilisé.

Milieu de perfusion totale (J.-André THOMAS) :

C'est actuellement du sang purhépariné, mais l'usage de l'héparine a dû être écarté pour la mise en survie des foetus car chaque expérience exige, en moyenne, 5 à 6 l. de milieu total et son usage, à ce taux, est prohibitif (2 cc. à 5 p. 100 par litre).

Le plus souvent, il a dû être employé un mélange de : sang défibriné, ou sérum, et solution saline (liquide de J.-André THOMAS).

Le milieu peut être plus ou moins glucosé et enrichi par des extraits frais d'organes.

Les expériences entreprises exigent une asepsie extrêmement rigoureuse. J.-André THOMAS conseille, à titre de précaution supplémentaire, d'ajouter des antibactériens au milieu : antibiotiques, par exemple 100.000 U.O. de pénicilline G. pour 5 litres de milieu, dans les expériences de culture de virus aphteux; du sulfate de dihydro-streptomycine, des sulfamides, 1 gr. à 1,5 gr. p. 1.000 de p. amino-phényl-sulfamide (thiazomide) ou mieux, 6-sulfanilamino-2-4-diméthyl-pyrimidine (elcosine). Pour la perfusion des foetus de vache il est utilisé, en principe, le sang défibriné de vache adulte, fraîchement préparé, dilué à 50 p. 100, au moment de l'emploi, avec la solution saline complète (p. 215) et contenant des antibactériens.

__Survie expérimentale massive des gros foetus de Mammifères__ .

Dans le but de la culture massive du virus aphteux, J.-[illegible] Louis et Léone ...LOUZE & François LA..Y, se sont proposés d'obtenir la survie prolongée des gros foetus de Bovin et, secondairement d'Ovin, isolés de l'utérus. Ces organismes doivent, nécessairement, être prélevés sur des animaux sacrifiés aux abattoirs sans précautions spéciales. Il est donc évident que des survies de quelques jours exigent des mises au point techniques continuelles.

Les expériences étaient, à leur début, hérissées de difficultés mais la simplification et l'organisation des procédés techniques nous permettent maintenant de renouveler les survies dans des conditions satisfaisantes, connues et comparables.

De nombreuses et minutieuses recherches préliminaires ont montré que la perfusion des gros foetus est, en réalité, beaucoup plus complexe que celle des organes adultes. Il s'agit, en effet, d'organismes entiers, fragiles, ayant une anatomie et une physiologie particulières.

Etant données ces circonstances, il a été nécessaire de se livrer d'abord à une étude des conditions en rapport avec nos buts expérimentaux, c'est-à-dire la perfusion physiologique totale et aseptique de tout le corps foetal.

La seule expérience antérieure qui peut se rapporter à nos expériences de perfusion de foetus est un essai décrit, succinctement, par CARREL & LINDBERGH (1938). Ces auteurs ont perfusé, aseptiquement, un tout jeune embryon de Chat par les vaisseaux du fragment d'utérus auquel il était fixé. Le milieu employé était un sérum homologue dilué à 50 p. 100 dans le liquide de Tyrode. En 24 h. l'embryon accusa une petite dégénérescence.

Recherches préliminaires :

Conditions de la perfusion du foetus :

Généralités :

La mise au point de la perfusion du corps foetal entier nécessaire aux buts expérimentaux a exigé l'emploi d'un minimum de [illegible] foetus de mammifères.

Circulation foetale :

Il n'y a pas de communication libre entre le système circulatoire de la mère et le système circulatoire du foetus. Après la saignée des vaches gravides aux abattoirs, le foetus conserve tout son sang.

Rappelons, bien qu'il s'agisse de faits classiques, que les foetus, objets des expériences (bovins et ovins) présentent __plusieurs particularités anatomiques__ (fig. 2). Le sang placentaire hématosé pénètre par les 2 veines ombilicales qui s'unissent en un tronc unique dans l'abdomen, puis revient par les 2 artères ombilicales ; les 2 oreillettes communiquent par le trou de Botal, par où le flot

[illegible] dans l'oreillette gauche ; la veine cave [illegible] à l'oreillette droite le sang placentaire [illegible] de sang veineux périphérique. La veine cave antérieure ne fournit que du sang veineux. Dans l'aorte postérieure, après l'abouchement du canal artériel, circule, en direction cranio-caudale, du sang venant des deux ventricules, le gauche lance le sang principalement artériel et le droit du sang surtout veineux. Le sang artériel comporte donc toujours une part de sang veineux.

Le rythme des battements du coeur varie naturellement avec la taille des foetus (1). Ceux que nous avons examinés dans ce but, après ouverture aussi rapide que possible de la cavité thoracique, et qui mesuraient une quarantaine de centimètres de long, ou un peu plus, comme dans le cas des expériences, avaient encore des fréquences cardiaques de 100 à 120 pulsations. Dans ces conditions, les battements deviennent plus ou moins irréguliers mais persistent un certain temps. Ils existaient encore chez un foetus de 40 cm. ½ heure après l'[illegible], alors que l'intestin ne manifestait pas de mouvements péristaltiques.

Coagulation du sang foetal :

De l'ensemble des essais préliminaires et des expériences, il résulte que le sang du foetus reste liquide dans les vaisseaux, pendant plusieurs heures, si l'animal est conservé [illegible] à la température [illegible]ve. Toutefois le sang extravasé coagule [illegible] et, d'ailleurs, partiellement.

Si l'utérus est ouvert avant l'extraction du foetus, le sang [illegible] peut être liquide dans la plupart des gros vaisseaux mais il est coagulé dans le début de la crosse aortique. Par contre, conservé dans un utérus clos et maintenu tiède, le foetus peut être [illegible] après plusieurs heures, et même 8 h. après l'[illegible]. C'est principalement cette circonstance [illegible]euse qui permet les expériences.

[illegible], d'ailleurs, que la rigidité cadavérique

---

(1) D'après [illegible] (1904), le coeur (foetus de brebis [illegible]) bat au rythme de 120 à 142 pulsations à [illegible]. Chez le foetus de brebis, de 1,400 K. environ, la pression artérielle est de 4,6 cm. et la pression veineuse de [illegible] cm. de mercure.
Pour BARCROFT, BARRON & FORSHAM (1942), la pression veineuse dans la veine ombilicale du foetus de mouton âgé de 56 à [illegible] jours serait de 6 à 18 mm. de mercure.

[illegible]

[illegible]

Au cours des essais préliminaires, il a été injecté, [illegible] système circulatoire des foetus, extraits ou non de l'utérus, [illegible] sérum physiologique [illegible] Pour cela il a été [illegible] soit d'une seringue, soit d'un injecteur à pompe avec contrôle manométrique. Le degré de la perfusion était vérifié, après autopsie, par la décoloration des organes du foetus ou, au contraire par leur coloration, lorsqu'un colorant, bleu de méthylène principalement, était ajouté.

Perfusion du foetus <u>in utero</u> :

Il est nécessaire d'irriguer alternativement les 2 artères utérines après ligature du vagin, des artères vaginales et utéro-ovariennes et de leurs anastomoses. Les utérines doivent d'ailleurs être coupées le plus près possible des iliaques, car elles se divisent en plusieurs ramifications.

Le liquide ressort par les veines utérines qui suivent sensiblement le trajet des artères. [illegible] que, dans ces conditions, le colorant ne peut pas passer dans [illegible] avec l'appareil, poursuivi pendant plus de 5 heures, au sang [illegible] dilué à 10 p. 100 dans de l'eau physiologique citratée à [illegible] [illegible] stérile de l'utérus, en pratique courante, de [illegible]

[illegible] isolé

L'idée venait évidemment à l'esprit de suivre [illegible] gique, c'est-à-dire de perfuser par une des artères ombilicales.

Veines ombilicales : celles-ci sont extrêmement fragiles et cèdent plus ou moins rapidement au niveau de la ligature posée sur [illegible] ; de plus, la fragilité du foie embryonnaire est un obstacle sérieux. Le liquide, après avoir pénétré dans le [illegible] se répand dans l'abondant lacis vasculaire du foie, [illegible] ge qui se gonfle le plus souvent et finit même par éclater.

Veine cave postérieure : pour atteindre [illegible] la veine cave il faut pratiquer des délabrements [illegible] les voies constituées par le canal [illegible] ou par la veine sus-hépa[illegible] tance. L'abouchement [illegible] niveau des reins, ob[illegible]

[illegible] viscères abdominaux [illegible] [illegible] la place et la même fragilité de la veine cave sont retrouvées, soit en arrière, soit en avant du diaphragme qu'il faut effondrer.

[illegible] peut être atteinte aussi par une sonde molle passée à travers le canal d'Arrantius, bien que cette manoeuvre soit assez difficile. Cette voie fragile permet le retour du liquide par les artères ombilicales sectionnées.

[illegible] à conserver le sens physiologique du circuit, la canule a été placée dans l'une des carotides, [illegible] de la tête. Ces artères sont [illegible] résistantes. La perfusion [illegible] que dans la tête et [illegible] (1).

Le retour se fait à gros débit par les artères ombilicales sectionnées au-dessus de l'ombilic où, si celles-ci sont liées, le foie éclate tôt ou tard.

Aorte abdominale : la perfusion par l'aorte abdominale, [illegible] ligature des artères ombilicales, est assez satisfaisante, mais entraîne diverses [illegible]. Il [illegible] de lier, au moins, le pédicule vasculaire du foie et d'introduire une sonde de retour dans la veine cave.

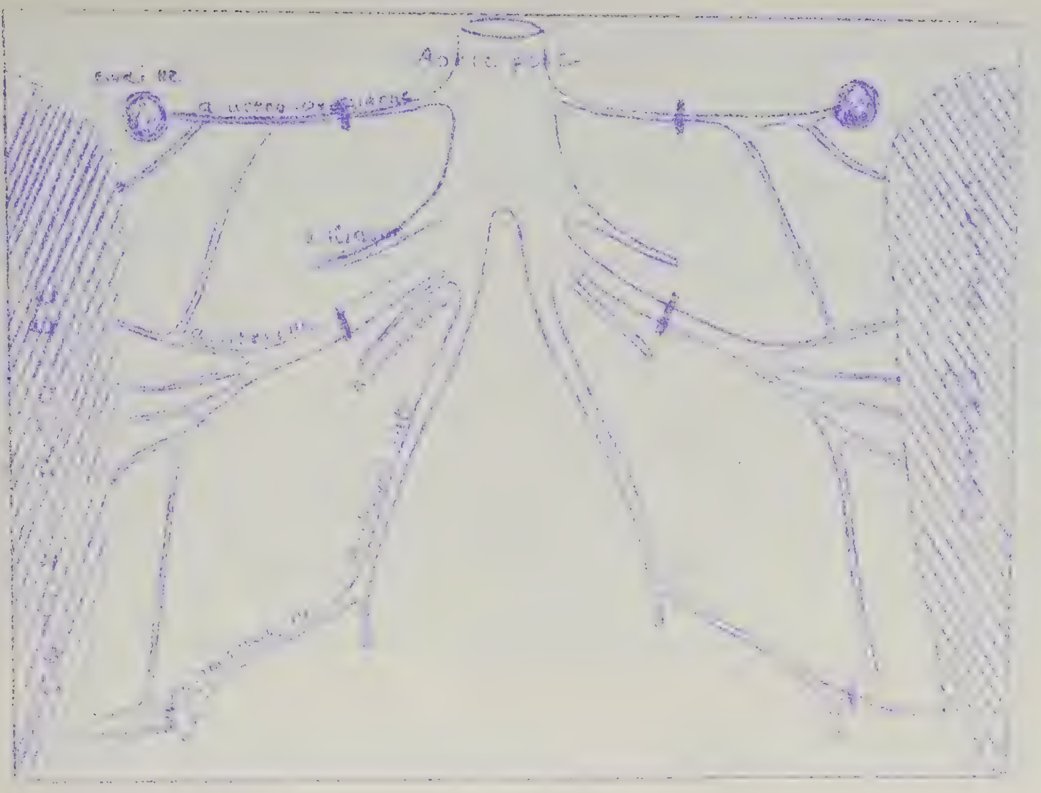
[illegible] du foetus est assez [illegible] l'aorte abdominale en arrière [illegible] artères ombilicales. La canule est [illegible]. Le retour veineux se fait [illegible] postérieure.

Finalement, la perfusion par une des deux artères [illegible] ; elle s'effectue, en partie, à contre-courant. Cette voie s'est révélée la meilleure et a été adoptée.

[illegible] foetus de vaches ou [illegible] expériences proprement [illegible] de l'organisme foetal [illegible] prendre certaines précautions. [illegible] artères [illegible] l'ombilic ; celui-ci est incisé [illegible] signification de cette section).

---

(1) Notons, d'après les essais de J.-André THOMAS, Louis [illegible] tête isolée de foetus [illegible] adultes, que la perfusion, [illegible] par les 2 carotides à la fois, le retour se fait par les jugulaires, à condition de colmater la circulation vertébrale.



Les traits per-
pendiculaires
aux vaisseaux
[illegible]

Fig. 1.- Schéma de la circulation utéro-ovarienne

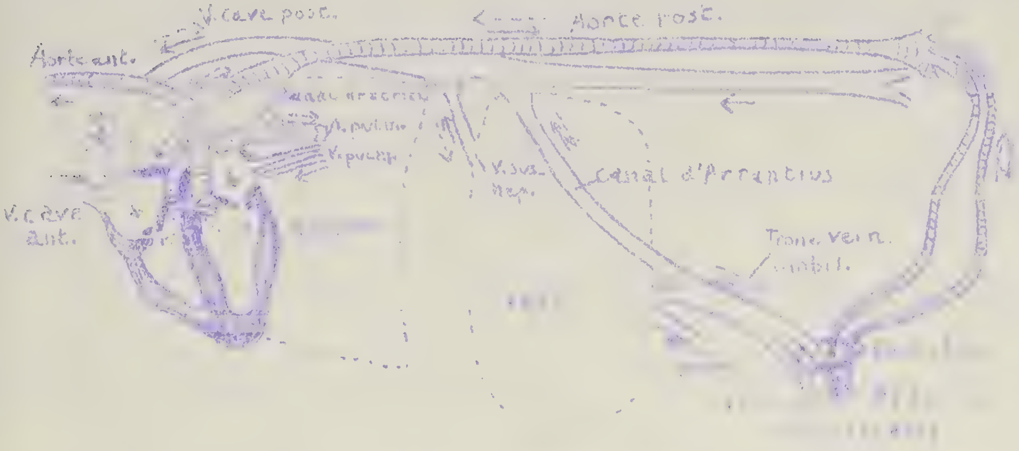
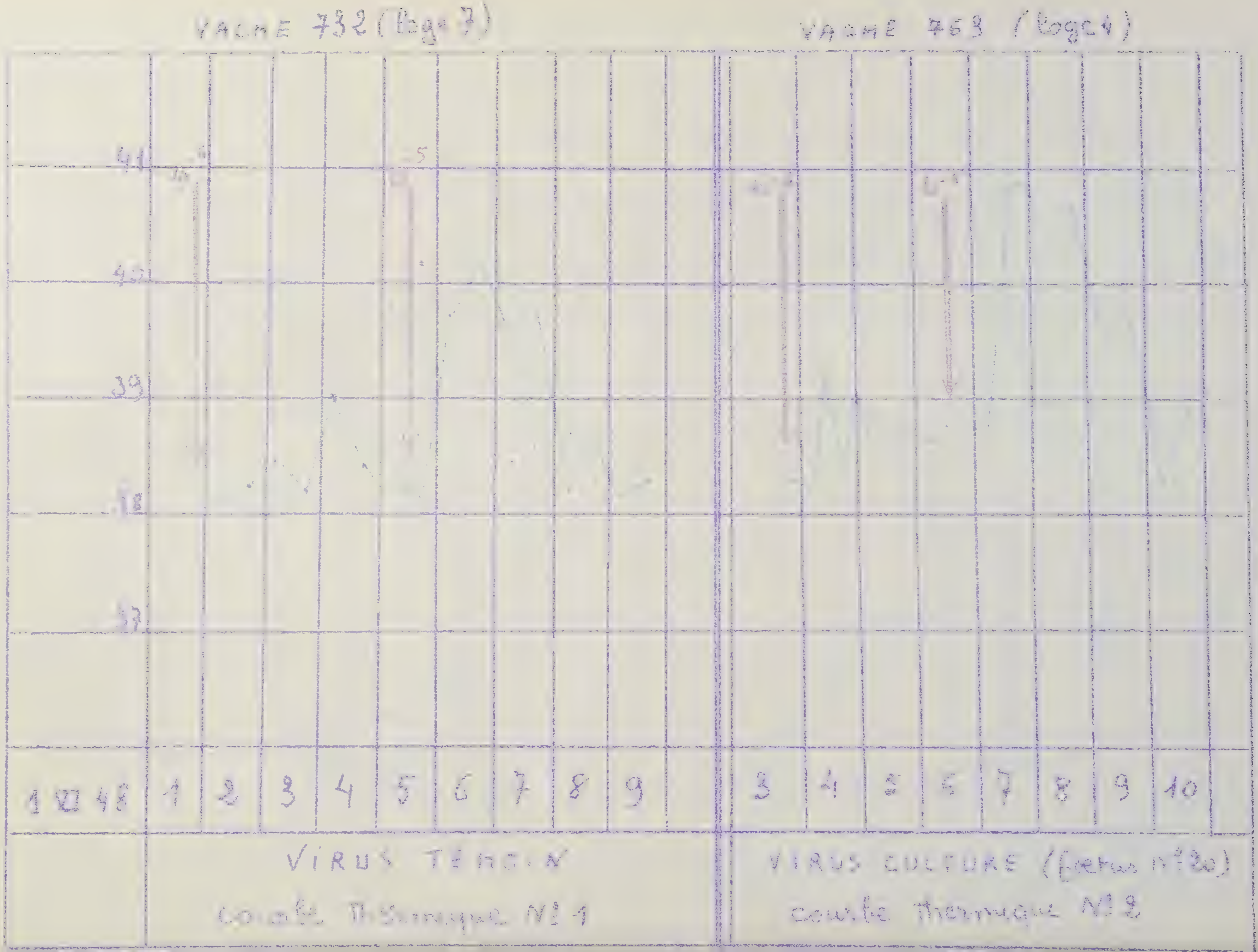


Fig. 2.- Schéma de [illegible] Inter-
prétation du circuit de perf[illegible]
par l'art[illegible]
(Extrait de l'article de [illegible]
Léone SALOMON. J. Phys. 1960, [illegible]

332

EXPÉRIENCE 27



la 2ème artère ombilicale est liée. L'expérience montre que le retour veineux se fait par la veine cave postérieure, puis par les conduits veineux hépatiques et, finalement, par le tronc commun des veines ombilicales, lorsqu'il est sectionné dans l'abdomen. Le retour est facilité, mais sans grand avantage, par l'introduction d'une sonde en gomme dans une veine ombilicale, jusque, si possible, dans le canal d'Arantius ; par contre, si rien ne s'y oppose, il est très avantageux de réséquer un lobe hépatique.

Il est intéressant de noter le rôle important des sphincters propres des vaisseaux ombilicaux. La section du cordon, sa ligature, l'injection d'un liquide, provoquent par réflexe leur contraction. Sur des foetus provenant de vaches fraîchement abattues, l'injection d'un liquide physiologique tiède dans les artères ombilicales s'arrête au niveau de [illegible].

D'autre part, dans les perfusions à contre-courant, la circulation de retour s'interrompt au niveau de l'ombilic (1).

On voit d'ailleurs très bien ce spasme lorsqu'on introduit, chez un foetus tout frais, une canule dans une artère ombilicale. Il faut attendre un certain temps et faire des efforts [illegible] pour que l'injection puisse vaincre le spasme. Quand l'animal est abattu depuis quelques heures, ce spasme ne se produit pas. A noter que chez les foetus dont le cordon a été sectionné depuis un certain temps, le sang est coagulé dans les veines jusqu'au niveau de l'ombilic, mais pas au delà.

Interprétation de la perfusion par la voie de l'artère ombilicale.

La perfusion par l'artère ombilicale avec ouverture partielle de la paroi abdominale, section du tronc veineux ombilical et [illegible]tion d'un lobe du foie, donne de bons résultats.

Lors de l'injection d'un liquide incolore, le foetus pâlit plus ou moins rapidement, selon sa taille, et les conditions particulières de l'expérience. L'autopsie, après perfusion prolongée, montre que, dans la majorité des cas, le lavage est total : [illegible]

---

(1) Si l'hémorragie des nouveau-nés s'arrête rapidement, lors de la mise-bas, c'est sans doute parce qu'en plus de la contraction de l'ombilic, les vaisseaux ombilicaux excités par les tiraillements et, selon les cas, par le coup de dent donné par la femelle, sont [illegible] par une vaso-constriction énergique et [illegible] peut-être, la coagulation du sang. Cette vaso-[illegible] réflexe peut être observée par une [illegible] de l'extrémité distale du cordon, dès la première moitié de la gestation (J.-André THOMAS, Louis et Léone SALOMON, [illegible]).

[illegible]HEIMER (1904) a observé que la contraction des fibres circulaires de la paroi des a[illegible] transmet plus une injection, à la [illegible] peut y pénétrer.

retrouve, en général, pas de sang, sauf dans quelques capillaires du cerveau ; cependant, dans quelques cas, l'oreillette et le ventricule gauches renferment quelques petits caillots sanguins, contrairement aux cavités droites. Le poumon est plus ou moins régulièrement perfusé.

Les particularités anatomo-physiologiques de la circulation foetale permettent d'interpréter les résultats observés. En suivant progressivement le trajet emprunté par des liquides physiologiques colorés, il semble que le système valvulaire du coeur gauche (sigmoïdes aortiques et valvule mitrale) résistent beaucoup plus longtemps au flux à contre-courant que celui du coeur droit (sigmoïdes de l'artère pulmonaire et tricuspide). En effet, dès le début d'une injection colorée, poussée doucement à la seringue, on s'aperçoit que le ventricule gauche est mal perfusé, alors que les deux cavités droites le sont de façon satisfaisante. Le liquide doit refluer de l'aorte, dans le canal artériel, puis dans l'artère pulmonaire. Il est vraisemblable qu'il en revient une faible quantité, selon le sens physiologique, dans le poumon, non fonctionnel. La majeure partie du flux poursuit donc son trajet à contre-courant dans l'artère pulmonaire et parvient ainsi dans le ventricule droit.

Bien que le colorant puisse pénétrer dans l'oreillette gauche par le trou de Botal, celle-ci est assez mal perfusée : tout se passe comme si son contenu ne se renouvelait qu'avec difficulté. Même après une perfusion prolongée pulsatoire pendant quelques dizaines d'heures, les cavités droites du coeur sont toujours mieux lavées que les gauches.

Le [illegible], selon la voie des artères ombilicales, [illegible] l'obstacle essentiel. Si, après un certain temps de perfusion, le flux pulsatile, [illegible] pression physiologique, arrive à forcer les valvules sigmoïdes de l'aorte et de l'artère pulmonaire, ainsi que la mitrale et la tricuspide, on conçoit qu'il puisse finalement pénétrer dans la veine cave postérieure. À remarquer, toutefois, que le sang qui arrive à contre-courant par l'aorte postérieure pénètre facilement dans les coronaires par suite de leur configuration anatomique : le myocarde est, lui-même, bien perfusé.

Par suite de la confluence des veines caves antérieure et postérieure sur la paroi de l'oreillette droite, la veine cave antérieure semble pouvoir se déverser dans la postérieure : la valvule incomplète d'Eustachi, et les quelques petites valvules du segment antérieur de la veine cave postérieure ne constituent pas un obstacle appréciable à la progression du sang à contre-courant dans ce vaisseau, jusqu'au niveau du foie.

D'autre part, il est également très probable que le liquide de [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] moindre obstacle au libre écoulement par celles-ci puisse amener [illegible] [illegible] ombilicales ; il est même préférable de réséquer aussi une partie du foie, si cela ne présente pas d'inconvénient.

Il en résulte que la perfusion de l'ensemble de l'organisme foetal par une artère ombilicale, seule voie possible, au moins de [illegible] train antérieur et le train postérieur sont perfusés de façon quasi normale, et cela dès que le lavage circulatoire commence, l'aorte [illegible] pré-hépatique, sont perfusées à contre-courant.

Toutefois, dans les branches de ces gros troncs, la circulation s'effectue dans le sens habituel et assure ainsi une perfusion normale du reste de l'organisme.

Perfusion aseptique du foetus

Prélèvement, transport et préparation des utérus gravides :

[illegible] [illegible] (1) [illegible] [illegible], en periode de non restriction et les lendemains de marchés, est suffisamment élevé pour qu'on trouve des foetus de toutes tailles, en particulier dans les tueries à vaches de basse qualité. Les foetus constituent, d'habitude, un sous-produit utilisé pour la récolte de la peau et des glandes.

[illegible] donnent les chiffres de 72.561 K. de foetus de vaches recueillis, [illegible] [illegible] en 1947 [illegible], 229.566 K. en 1950 (Directeur M. BREVOT). Ces chiffres s'adressent [illegible] 40 [illegible] utilisés pour les glandes et

---

(1) Nous tenons à remercier vivement Messieurs les Directeurs et les Membres des Services Sanitaires Vétérinaires de la Seine de leur aimable appui. Nos remerciements vont en particulier au [illegible] Chef du Centre de Prélèvements biologiques qui a mis à notre disposition ses connaissances et son laboratoire

la peau, ils ne correspondent pas exactement aux foetus qui nous intéressent qui doivent être plus petits, 35 à 40 cm. étant notre limite supérieure ; ces petits foetus sont, la plupart du temps, abandonnés dans l'échaudoir.

Les vaches sont généralement abattues debout et s'affaissent brutalement. Cette chute qui écrase, plus ou moins, l'utérus, les réflexes de l'animal agonisant, les habitudes des tueurs qui, pour favoriser l'écoulement du sang par les vaisseaux du cou, pressent du pied sur l'abdomen, sont autant de causes de traumatismes graves du foetus. On constate, en effet, fréquemment chez celui-ci des hémorragies internes et, assez souvent, la rupture traumatique du foie (c'est ainsi que sur 15 foetus de veaux prélevés dans la même matinée, 10 avaient un éclatement de cet organe).

L'idéal serait d'obtenir chaque fois des foetus provenant de vaches tuées en position couchée, comme cela se fait d'ailleurs pour les taureaux selon certains rites religieux, ou de façon habituelle pour les ovins ; encore faudrait-il que les animaux sacrifiés fussent étendus doucement sur une litière.

Pour les expériences, nous avons été réduits à choisir des foetus extraits d'utérus aussi indemnes que possible provenant de vaches abattues.

Une fois la vache dépouillée et suspendue, l'utérus est examiné par palpation, dès l'ouverture de l'abdomen, il est ensuite libéré par section des ligaments larges et du vagin en avant du museau de tanche. En pratique, 20 à 30 minutes s'écoulent entre l'abatage et le prélèvement. Chez les ovins toutefois ce délai est plus court, le prélèvement peut être effectué avant le dépouillement.

L'utérus est déposé sur un champ, ses pédicules vasculaires gauche et droit sont aussitôt fermés par des pinces de Kocher stériles. Ainsi préparé, il est introduit dans le coffre métallique flambé d'une étuve portative, puis apporté rapidement, en automobile, au laboratoire. Cette étuve à paroi d'eau est chauffée à 40° par une résistance électrique. A la rigueur, une caisse à couvercle suffit.

Dès l'arrivée au laboratoire, l'utérus est posé sur un plateau flambé, il est lavé soigneusement à l'eau tiède savonneuse, séché, entièrement badigeonné à l'alcool iodé, puis placé à l'étuve à 38° où il se dessèche en surface avant l'opération. On voit donc que l'utérus est maintenu, autant que possible, à la température physiologique, depuis son extraction jusqu'au début de l'intervention chirurgicale. Il a été indiqué.

[illegible]

[illegible]

Nous avons rigoureusement suivi, en équipe, le procédé [illegible] pour la préparation des gros organes. Ce [illegible] [illegible]oire peut être exécuté en 10 minutes. Il exige des [illegible] [illegible] tion d'eau sous pression. L'installation est identique à celle d'une salle d'opération courante : blouses, calottes, gants, [illegible] teurs aux mains gantées et un aide sont indispensables. Après 2ème badigeonnage à la teinture d'iode, la corne utérine gravide est incisée, d'un seul coup, sur presque toute sa longueur. Les lèvres de la plaie, solidement maintenues par des pinces, sont levées au maximum et écartées. Le chorion et l'amnios sont ouverts avec de nouveaux instruments. On coupe le cordon sans le pincer au préalable à une dizaine de centimètres de l'ombilic, alors que le foetus baigne encore dans son liquide amniotique.

Ainsi libéré, le foetus est saisi d'une main par les membres, extrait avec précaution de l'utérus, et posé sur un plateau. Il [illegible] à titre de protection bactériologique supplémentaire.

Pose de la canule : La succession des temps opératoires est dès lors la suivante : incision longitudinale du cordon ombilical et dégagement des 4 vaisseaux, section de l'ombilic, d'une partie as[illegible] une d'elles), enfin pose d'une canule métallique dans l'une des deux artères ombilicales et ligature de l'autre (1).

Lavage circulatoire : Le lavage de l'appareil circulatoire foetal commence immédiatement. La canule est déjà fixée à son tuyau de caoutchouc et à son petit raccord de verre, lui-même relié à la tubulure du flacon laveur, ainsi qu'il a été indiqué (p. 328). [illegible] près d'un litre de liquide tiède, à une pression ne dépassant guère, en principe, 5 à 6 cm. de mercure, contrôlée continuellement au manomètre.

---

(1) Les veines et les artères ombilicales se distinguent assez aisément. Les veines se dirigent vers la région abdominale antérieure, les artères cheminent en direction postérieure vers la vessie : elles ont une paroi plus épaisse et plus résistante que celle des veines.

[illegible] le sang [illegible] le polyvinyl-pyrrolidone à 3,5 p. 100. [illegible] solutions, qui ne sont pas anticoagulantes par elles-mêmes, permettent de pratiquer le lavage circulatoire [illegible] nes conditions, étant donnée la lenteur de la circulation du sang dans les vaisseaux du foetus.

Pour le lavage qui chasse mécaniquement le fibrinogène, les liquides salins anticoagulants [illegible]

Le foetus, naturellement rosé, se décolore progressivement et devient pratiquement exs[illegible]

[illegible]tallation dans l'appareil : Lorsque le lavage est jugé suffisant, le tuyau de caoutchouc du flacon-laveur est obturé par une pince de Terrier et coupé en deçà de celle-ci. Le foetus est alors posé sur un 2ème plateau, débarrassé à la compresse des caillots sanguins qui peuvent le souiller, puis transporté dans la cuve à organe de l'appareil.

Le branchement sur la circulation artificielle consiste à raccorder, sans bulles d'air, le tuyau de caoutchouc, libéré de sa pince, en le liant sur la [illegible]tine artérielle de la cuve. Le foetus peut baigner ou non, suivant les cas, dans le liquide artériel [illegible] renouvelé. Le plus souvent, le montage de la cuve est disposé en vue d'une irrigation artérielle avec pulsations, le caoutchouc de [illegible] est coupé à la hauteur supérieure du foetus. La cuve est fermée par son couvercle de verre, vaseliné et luté à la paraffine.

[illegible]ise en marche de l'appareil : L'appareil est roulé [illegible] chambre-étuve à 37°, relié au branchement électri[illegible] et mis en marche, l'artère de l'organe [illegible] ouverte. Le ré[illegible] la pression se fait par fermeture progres[illegible] dérivation et ouverture simultanée de l' [illegible] débit de l'artère est réglé par sa pince [illegible] la circulation du mélange respiratoire [illegible]

Il suffit de surveiller de temps en temps [illegible] pH du milieu.

[illegible]on générale des expériences de perfusion

Conditions générales :

[illegible]iences proprement dites de perfusion phy-

[illegible]
de [illegible] à 6 mois ½ environ.

[illegible] délais compris entre [illegible]
[illegible]
[illegible] expériences, de les [illegible]
[illegible] tion).

[illegible] conditions [illegible] des expériences sont [illegible] tant que possible, [illegible] celles de l'organisme vivant.

[illegible] les conditions des expériences : température [illegible] entre [illegible] et [illegible] fréquence du [illegible] artificiel de [illegible] [illegible] à la minute [illegible] est pratiquement [illegible] l'entretien [illegible] pression du liquide artériel de [illegible] limitée, au minimum à 0,5 cm., et au maximum à 5 cm. de mercure. Des pressions basses, avec différentielle [illegible], [illegible] comme il a déjà été signalé, à celles du foetus.

[illegible] utilisé pour l'oxygénation [illegible] dans le poumon artificiel a été, soit celui qu'utilisait [illegible] [illegible] 3.

Les expériences n'ont pas été prolongées au delà de [illegible] culture [illegible]
[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Cinq à six litres de milieu de perfusion sont nécessaires. Ce milieu est composé, comme indiqué plus haut, de sang d[illegible] ou héparinė, parfois de sérum de vache dilué en général à [illegible] [illegible]

[illegible]

[illegible] : le milieu [illegible] garde sensiblement son aspect physique : [illegible] dès le début de la perfusion, par suite du fonctionnement du poumon artificiel, il ne brunit que d'une façon très légère. Il est homogène, n'est pas hémolysé, les hématies ne sont pas agglutinées. Il renferme des leucocytes [illegible] que l'on peut récolter par centrifugation, au-dessus du culot de globules rouges. Il a l'odeur du sang foetal. Enfin, il est stérile, comme le montrent l'examen bactériologique et les [illegible] sur milieux liquides et solides.

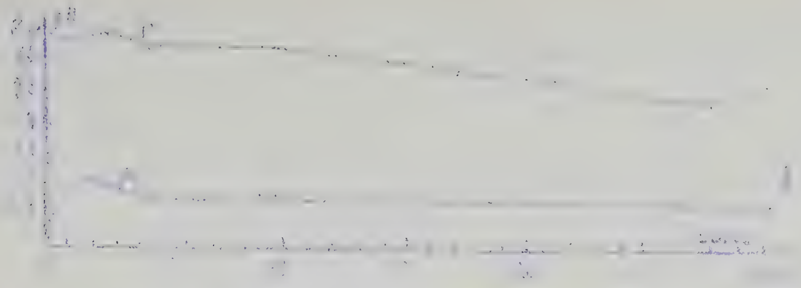
Evolution du pH : Quelques détails sur l'évolution du [illegible] doivent être donnés, vu son importance et son intérêt pratique en cours d'expérience.

Le pH est mesuré, sans délai, à l'électrode de verre, sur des prises toujours faites dans les mêmes conditions.

La stabilité relative du pH, qui est évidemment une condition physiologique essentielle, est assurée, dans le milieu que nous employons, par un système tamponné de phosphates, pratiquement suffisant en présence des protéines du sang.

On voit, par exemple (fig. 3A) que le pH d'un tel milieu [illegible] de la perfusion d'un foetus ♀ de 40 cm. [illegible] d'heure après la mise en train de la circulation artificielle. Il s'abaisse légèrement au bout [illegible] par suite du métabolisme du foetus très vraisemblablement, puis s'équilibre, en 4 h.30, à pH 6,9. [illegible] ensuite jusque vers la 31ème [illegible] milieu est renouvelé, par moitié [illegible] l'expérience se poursuit alors et dure [illegible] température de 39° C. Elle est [illegible]

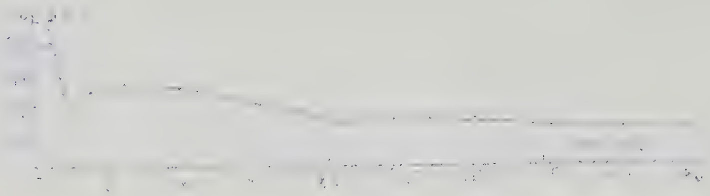
[illegible] le pouvoir tampon de ce milieu est accru par [illegible] sodium (1 gr. p. 1.000), [illegible] évolution du pH ajusté à 7,95 est également [illegible] (fig. 3B) pendant toute la durée de l'expérience (50 h.). Un tel milieu au sang, rendu [illegible] de glucose [illegible] nos raisons expérimentales particulières [illegible] de pyruvate de sodium, 2,5 gr. [illegible] après la légère acidification [illegible] l'embryon, se réalcaliniser [illegible] heure (fig. 4) : il passe [illegible] l'expérience, à pH 7,25 après



[illegible] ... es 31 h. Durée to[illegible] perfusion [illegible]

Fig. 4.- [illegible] 27a [illegible] ertonique : sang [illegible] J.U. de penicilline pour [illegible]

Fig. 5.- [illegible]



6 [illegible] (Exp. [illegible]) [illegible] de [illegible] milieu [illegible] liquide tamponné [illegible] et 3 [illegible]

[illegible] du milieu de perfusion [illegible] infection. [illegible] de 47 cm [illegible] opéré [illegible] indique [illegible] début du noircissement du sang. Infection [illegible]

[illegible] extraites [illegible] La survie aseptique des [illegible] aseptiquement [illegible]

46 h., sans renouvellement. L'adjonction de pénicilline provoque une rapide, mais légère acidification (100.000 U.O. pour 9 litres de milieu).

Si le sang est supprimé et l'apport protéique représenté, à l'occasion d'expériences spéciales, par des peptones de caséine par exemple, le pH se maintient encore relativement stable (fig. 5).

La source de protéines est, parfois, totalement supprimée. [illegible] pyrrolidone plus ou moins glucosée qui rétablit, de façon appro- [illegible] et glucosé à 40 gr. par litre a été, parfois, employé seul. [illegible] tabolisme foetal, s'accuse plus rapidement, mais le pH peut rester relativement stable pendant près de 45 h. (fig. 6).

D'ailleurs, l'évolution de la courbe de pH, en cours d'expérience, est souvent un bon test de stérilité. Si le foetus est contaminé (cela s'est produit dans le cas où l'on n'a pu opérer que 7 h.40 après l'abattage de la vache), le milieu s'infecte peu [illegible] l'infection microbienne devient importante (p. 60 fig 7).

Evolution du foetus au cours de la perfusion :

Dès que l'organisme foetal est branché sur la circulation artificielle, le milieu sanguin le perfuse rapidement tout entier et lui redonne les couleurs de la vie.

Respiration : L'influence du foetus sur le milieu devient visible après 1 h. de perfusion environ : d'abord entièrement ru- [illegible] qui revient de l'embryon est, dès lors, manifestement veineux : [illegible] te rouge rutilant, celui des tubulures veineuses est rouge violacé [illegible] sion abdominale, sont parcourus par des artérioles rouges, tandis que le système de leurs veinules est bleuâtre.

Autres variations métaboliques : Quelques dosages, dont on ne doit tenir compte qu'à titre d'indications pré[illegible] blent montrer que le taux de glucose décroît dans le milieu [illegible] exemple, de 40 gr. p. 1.000 de glucose, n'en contient plus que 27 gr. p. 1.000 après 46 h. de perfusion.

Le foetus produit de l'urée : c'est ainsi que le taux d'urée, dans le milieu, passe de 0,15 gr. p. 1.000 après 3 h.30 de perfusion, à 0,25 gr. p. 1.000 après 45 h. ; le taux de l'urée

[illegible] atteint [illegible] [illegible] 1,20 gr. p. 1.000, respectivement après [illegible] et 48 h. de perfusion).

Réaction biologique du foetus aux [illegible] : [illegible] que, pendant l'opération, [illegible] par les doigts, les régions [illegible] se marquent, pendant les premières heures de [illegible], [illegible] d'ecchymoses qui se constituent [illegible].

Mouvements péristaltiques : Les mouvements péristaltiques qui n'existent jamais au début des expériences, peuvent apparaître, même en milieu non [illegible]. [illegible] d'une perfusion d'un [illegible] après l'abattage avec [illegible] au polyvinyl-pyrrolidone ([illegible] gr. p. 1.000), non glucosé, renfermant [illegible] p. 1.000 de [illegible] (pH [illegible], 39° C., pression 1-4 cm. mercure, [illegible] oxygène pur), l'intestin grêle a [illegible] environ [illegible] h 45 après le début de la circulation artificielle, à manifester des mouvements [illegible] après l'adjonction d'extraits embryonnaires [illegible] (coeur et thymus d'un foetus de [illegible] cm.). Puis [illegible] a fait, à son tour, des mouvements de grande amplitude qui ont été plus [illegible] encore une vingtaine d'heures après la mise en survie. Un foetus témoin conservé à 39° dans l'utérus n'a [illegible] de mouvements péristaltiques.

[illegible] : Le foetus peut présenter un certain oedème [illegible] de la perfusion, mais celui-ci dépend des conditions expérimentales. Le lavage circulatoire préalable joue un rôle certain dans le développement ultérieur de cet oedème ; la manière d'effectuer ce lavage est indiquée plus haut. D'autre part, la perfusion des organes dans l'appareil peut être accompagnée d'une irrigation externe, artérielle ou veineuse, selon le montage de la [illegible] André THOMAS [illegible] le foetus baigne ou non dans le milieu [illegible] nette sur l'évolution de l'oedème. [illegible] perfusé ne plonge pas [illegible] apparaît, en général, après [illegible] s'accroît, plus ou moins [illegible] stabiliser. Par contre, [illegible] accompagné d'une irrigation par un [illegible] renouvelle le liquide où baigne l' [illegible] est insignifiant pendant toute la [illegible]

Dans le cas où les conditions expérimentales de la perfusion ne sont pas suffisamment convenables, des pétéchies, quelques phlyctènes, de la congestion des extrémités, apparaissent. Mais la longue et minutieuse mise au point des expériences permet, maintenant, l'obtention des foetus qui, en fin de perfusion aseptique prolongée pendant 30 à 40 h., ou plus, gardent toute leur souplesse, n'ont, pour ainsi dire, pas d'oedème, ne portent pas de phlyctènes et seulement quelques pétéchies.

Etat anatomique et physiologique du foetus après perfusion aseptique prolongée :

Etat anatomique :

Les organes des foetus, après perfusion prolongée au milieu sanguin, sont, pour la plupart, dans un état anatomique satisfaisant : l'ensemble du tube digestif, la rate, l'appareil respiratoire, l'appareil génital, les glandes endocrines comme la thyroïde, le thymus, les surrénales, enfin les muscles, l'oeil y compris la rétine.... conservent leur forme, leur couleur et leur consistance normales, même après une survie de 50 h.30. La peau est souple et résistante.

Le foie, les reins, le coeur, présentent des altérations plus ou moins appréciables macroscopiquement. Dans tous les cas, le foie est l'organe le plus lésé : son parenchyme devient jaunâtre et friable. Les reins sont assez souvent d'aspect pulpeux cependant, lorsque toutes les conditions techniques sont satisfaisantes, ils ont, au moins en partie, un aspect quasi normal. A signaler que le rein situé en position déclive est généralement plus altéré que l'autre. Le myocarde peut avoir l'aspect "cuit", mais si l'expérience est bien conduite, ses caractères normaux sont sensiblement respectés. La structure générale du poumon est conservée, mais la perfusion peut être irrégulière et entraîner un décollement de la plèvre. Le cerveau a bon aspect général, avec des circonvolutions bien dessinées, toutefois sa consistance semble fréquemment plus molle.

A la suite d'expériences particulières dans lesquelles les protéines sanguines ont été remplacées par des peptones de caséine, certains viscères du foetus ont été profondément altérés. Il s'agit, en quelque sorte, d'un "choc peptonique" : la pulpe splénique qui, dans les perfusions au sang, garde un bon aspect, est, dans ce cas, complètement liquéfiée ; le thymus qui est, d'habitude, de couleur blanc rosé est ici grisâtre et dégénéré , enfin d'abondantes suffusions, sous forme de travées de couleur groseille, s'observent sur le coeur.

Etat histologique

L'examen histologique de la plupart des organes montre que dans l'ensemble, leur structure propre n'a pas subi de modifications très considérables. On note, selon les cas, une réaction inflammatoire, plus ou moins accusée, de type quelquefois éos-

[illegible] tain oedème interstiti[illegible] tiques. Le foie est le plus altéré : [illegible] tiques conservent leur organisation, [illegible] sociées. Les foyers de pycnose sont abondants [illegible] pe splénique garde sa texture, mais les pycnoses [illegible] fréquentes, [illegible] une [illegible] quantité de noyaux minces, très allongés, souvent f[illegible] xueux. Les glomérules du rein sont assez bien [illegible] tés, mais on observe dans cet organe, ainsi que dans le pancréas, les capsules surrénales et l'inte[illegible] [illegible] avec infiltration lymphocytaire ; les zones de [illegible] [illegible] mon. La thyroïde est très infiltrée d'hématies qui [illegible] liéale perfusée est oedématiée et ses noyaux pycn[illegible] ques. La striation des fibres myocardiques et mus[illegible] laires reste très nette. Les organes génitaux, l[illegible] phage et les réservoirs gastriques sont d'aspect n[illegible] mal ; on note seulement quelques pycnoses dans le [illegible] net. Enfin, si le derme est infiltré et souvent pyc notique, l'épiderme foetal maintient ses caractères. On constate, en général, l'intégrité des follicules pileux en formation.

Test de la survie cellulaire :

La mise en culture, après perfusion aseptique prolongée, de fragments de tissus prélevés à divers organes du foetus, est le meilleur test de vitalité cellulaire. On verra plus loin que la culture d'un virus sur ces cellules apporte une preuve supplémentai[illegible] de leur vitalité.

La technique simplifiée de J.-André THOMAS of[illegible] [illegible]st, entre autres avantages, celui d'employer du [illegible]riel homologue au foetus, a été utilisée. ([illegible] 1948, 40, 123).

[illegible] fragments, finement découpés, sont lavés en [illegible]iologique tamponnée de J.-André THOMAS. [illegible] fragments sont ensemencés, ensemble, en [illegible] D5, dans le mélange suivant :

[illegible] hypertonique de Jovin	X gouttes
[illegible]	[illegible]
[illegible]tré de rate de [illegible]	II gouttes

[illegible] peuvent être conservés à la [illegible] jour avant la mise en culture.

Des [illegible] se développent plus ou moins, en général [illegible]. [illegible] Les [illegible] type [illegible], soit du type épithélial. [illegible], d'une part, [illegible] des cellules [illegible], des fibres [illegible] de grande taille en cours de [illegible], parfois le [illegible] d'un [illegible] et, d'autre part, des bourgeons épithéliaux ou des nappes étal[illegible] en surface et limitées par un bord épithélial individualisé.

Conclusions :

Malgré les imperfections que nous allons, brièvement, [illegible] le premier stade des recherches est, en grande partie, atteint, puisque les cellules du foetus restent vivantes le temps suffisant à la culture du virus aphteux.

Les conditions [illegible] sont plus favorables [illegible] de la vie tissulaire [illegible] Toutefois, nous venons d'examiner les [illegible] de son action sur le milieu. [illegible] ce dernier contient des produits toxiques, le foetus éprouve une sorte de "choc" (rigidité et altération).

Si l'on désirait poursuivre plus longtemps la durée de [illegible] des foetus, il serait indispensable de "repiquer" le foetus [illegible] sur un milieu neuf, c'est-à-dire, pratiquement, de transporter la cuve sur un autre appareil et ainsi tous les 3 à 4 jours. [illegible] lieu devrait être plus complet. Les circonstances financières [illegible] mettent actuellement ces expériences.

La voie de perfusion par l'artère ombilicale est certain[illegible] la plus pratique, mais elle n'est pas physiologique, la tr[illegible] placentaire, et un milieu à base de sang de foetus, auraient [illegible] [illegible]éciables : les conditions matérielles, ou de [illegible]

[illegible]

[illegible]ue à une [illegible] foetus [illegible]
[illegible] 10 litres [illegible], a rendu les [illegible]

[illegible] l'[illegible]ration est maintenant facile. De même [illegible] [illegible]REL comme une réaction physiologique, [illegible] perfusion est conduite correctement : [illegible] dans le liquide de J.-André THOMAS, lavage à [illegible] se pres[illegible] non irritant, immersion du foetus dans [illegible]

[illegible]

[illegible] en [illegible] [illegible]cière. La croissance [illegible] lente, comme s'il s'agissait de tissus adultes : J.-André THOMAS pense qu'il peut s'agir de substances inhibitrices de la multi-
[illegible]

Quoiqu'il [illegible] atteint, permet d'envisager de nombreu[illegible] physiologie, de biologie cellulaire, [illegible] pathologie, de bactériologie. C'est [illegible] qui nous intéresse et que nous abordo[illegible] dans la description de l'utilisation du f[illegible] comme milieu vivant de culture du virus de l[illegible] aphteuse.

a) <u>Culture du virus aphteux sur foetus en survie in vitro</u> :

La culture sur foetus isolé de l'utérus et [illegible]tenu en survie *in vitro* paraissait souhaitable et pr[illegible]tique si une technique codifiée était établie. La méthode de J.-André THOMAS, J.-Pierre THIERY, Louis et Léone SALOMON, a donné toute satisfaction, après de nombreuses et difficiles mises au point. Celles-ci étaient complexes car le maintien de la vie du foetus et celui du virus n'obéissent pas aux mêmes lois [illegible]iques ; un milieu légèrement alcalin et faiblement réducteur est souhaitable pour la culture du virus.

[illegible]

Nombre [illegible]

Les essais ont porté sur 36 foetus bovins. Ils [illegible] de l'inoculation du virus :

expériences de primo-inoculation	30 foetus
expériences de virus de passage	6 foetus

et répartis en 3 séries, selon les modalités de la perfusion :

perfusion et inoculation simultanées	23 foetus
perfusion préalable à l'incubation	6 foetus
incubation sans perfusion	7 foetus

Le nombre de vaches utilisées pour le titrage des virus de départ, ou de culture, s'élève à 87, et le nombre de cobayes à 78.

Schéma d'une culture-type de virus aphteux sur foetus perfusé aseptiquement :

Les conditions générales de perfusion, pour obtenir une culture, sont les suivantes :

L'utérus contenant un foetus de 4 à 5 mois est recueilli aux abattoirs et transporté au laboratoire.

Le foetus est isolé en chambre stérile. Après la pose de la canule [illegible] le foetus, couché sur le plateau, est inoculé avec un virus titré sur bovin. Cette opération demande une dizaine de minutes ; le foetus est alors placé, à l'étuve, dans l'appareil de J.-André THOMAS, à une température et pendant un temps que nous avons volontairement fait varier pour rechercher les conditions optima de culture.

Aussitôt la perfusion terminée, la peau, les organes inoculés [illegible] le jour même de la culture, le virus filtré de départ, c'est-à- [illegible] l'expérience, la peau du foetus perfusé est, également, titrée sur Bovin.

Un 2ème type d'expérience (n° 32 à 37), de résultat moins [illegible] sion. Les organes ont le temps de reprendre une certaine activité et le pH de devenir moins acide, ce qui devrait permettre une meilleure fixation du virus. L'incubation se poursuit ensuite, à 37°, sans nouvelle perfusion du foetus.

Dans une dernière série, témoin, nous avons voulu nous assurer de la survie du virus, ou de sa culture, sur des foetus inoculés dans les mêmes conditions, mais non perfusés.

Différenciation des conditions favorables et défavorables à la culture du virus aphteux :

Les perfusions sont conduites selon les procédés que nous venons de décrire. Nous étudions, maintenant, les facteurs influençant la culture, et ayant trait au foetus, au virus, au milieu de perfusion, aux modes et évolution de la perfusion.

[illegible]

Les conditions de récolte des foetus aux abattoirs de [illegible] [illegible] tels que la race, l'âge (au point de vue multiparité), peu [illegible] trôlés, mais importent très peu.

Plus importants [illegible] décelables, sont les antécédents pathologiques et, en particulier, une atteinte antérieure de fièvre aphteuse ; celle-ci peut ne laisser aucune trace. Quant au nodule de vaccination anti-aphteuse produit par le vaccin VALLÉE [illegible] pas toujours observé avec certitude dans les conditions [illegible] du dépouillement aux abattoirs. Aux Abattoirs de la Villette, seul un nombre insignifiant en a été décelé ; les observations ont cependant été faites pendant [illegible] grand nombre de bovins ont été vaccinés sur tout le territoire.

L'examen de la carcasse, de la peau, des viscères montre les lésions anatomopathologiques. Dans tous les cas de suspicion [illegible]

[illegible] niveau [illegible]

[illegible] par [illegible] trouve [illegible] volume de 1 [illegible] jours [illegible] ou d'une [illegible] est très [illegible] sommes [illegible] âgés [illegible] de terre peu trop [illegible] cent[illegible]

[illegible]

Le [illegible] porte [illegible]

[illegible]

Dans quelques cas, le liquide amniotique garde sa couleur mais il est trouble ; cependant aux ensemencements, en divers milieux, [illegible] pas altérés par la suite.

Dans un cas (exp. 13ter), expérience témoin, un foetus de 50 cm [illegible] putréfié, progressivement pendant l'incubation, à partir de l'abdomen, ce qui peut laisser supposer une infection d'origine ombilicale.

Ces exemples, heureusement rares (3 sur 39), prouvent que l'état du foetus, très important pour nos essais de culture, est un [illegible] mais dont il faut tenir compte.

Délai entre l'abatage et le début de la perfusion :

Les utérus sont transportés rapidement, en camionnette, de l'abattoir au laboratoire. L'utérus est alors lavé à l'eau tiède savonneuse, puis badigeonné d'alcool iodé et de teinture d'iode. Il est déposé dans une étuve à 37°, jusqu'au moment du prélèvement du foetus.

Aucune condition spéciale différente de celles requises pour les perfusions proprement dites n'est exigée.

[illegible] moyenne, d'une demi-heure, le délai entre l'abatage et l'inoculation [illegible] (exp. 27), 2 h.10 (exp. 25), 2 h.30 (exp. 14), 3 h. (exp. 19 et 29), 3 h.30 (exp. 12 et 16), 4 h. (exp. 10 et 22).

Le temps qui s'écoule entre l'abatage de la vache et la mise en survie du foetus est très variable, suivant les expériences ; très court pour certaines (1 h.), il a pu atteindre 8 h., par suite de circonstances indépendantes de notre volonté.

Dans la série des expériences où l'inoculation du virus est faite pendant le lavage circulatoire, et où la perfusion dure tout le temps de l'expérience, il a été obtenu des résultats positifs et négatifs avec les mêmes délais. Ainsi l'expérience 16 où il s'est écoulé 3 h. entre l'abatage et la perfusion est positive, alors qu'avec le même délai l'expérience 15 est négative. Dans l'expérience 27, positive, le délai est de 1 h.50, alors que l'expérience 23 est négative avec [illegible] contre, dans l'expérience 10 où l'attente est de 4 h., le résultat est positif et, dans l'expérience 21, où elle n'est que de 2 h., est négative.

Dans la série d'expériences où la perfusion du foetus ne dure que quelques [illegible] est inoculé à la fin de la perfusion, pour [illegible] semble que la fraîcheur du foetus ait une grande importance. Sur 7 expériences, la seule positive est celle qui a débuté 1 h.30 après l'abatage ; les conditions du milieu, du pH, de la température, sont à peu près identiques pour toutes [illegible]

[illegible]

Type

[illegible] sont d'accord pour considérer le type [illegible] à l'expérimentation, en raison de ses caractères de stabilité ; c'est ce type qui a été utilisé sauf dans 4 expériences : 11, 13, 13bis et 13ter (virus C). Les résultats positifs de l'expérience 13 laissent penser que la culture de n'importe quel type de virus est possible.

Les virus de la collection du Laboratoire de Recherches [illegible] : type [illegible] : Pontoise et Groot-Amers, type C : Brescia. Ils sont entretenus par passages fréquents sur bovins. Les souches ne montrent pas de différence culturelle selon leur origine. Des résultats positifs ont été obtenus avec toutes les souches. Pour les cobayes, les virus d'origine bovine ont un titre trop irrégulier et une virulence trop faible. [illegible], dans la majorité des [illegible] sur bovins. Ces virus, filtrés [illegible], sont [illegible] à 10-[illegible] [illegible], à 10-7, par injection intradermique (1 cc.) dans la langue.

Les virus [illegible] cobayes sont des types O et A [illegible]. Ils ne sont utilisés que pour [illegible] et expériences complémentaires sur [illegible] sur bovins n'est [illegible] passages sur ceux-ci, ils sont, [illegible] expériences sur foetus. Leur titre [illegible], est de 10-4, la [illegible]

[illegible]

[illegible] possible, rajeuni par un [illegible] aphtes sont recueillis [illegible] l'inoculation au foetus [illegible] pour l'essai de culture [illegible] présente aucun in[illegible] après une con[illegible] a un titre fai[illegible]. Ce délai de con[illegible] le seul facteur [illegible] mais il [illegible]

[illegible] dans [illegible] glycérine [illegible] par la Commission [illegible] biologique tam[illegible]

pH 7,6 ou en milieu de J.-André Thomas (solutions 1 + 2). Les fragments sont soigneusement rassemblés entre 2 feuilles de buvard, pesés, découpés aux ciseaux dans un mortier, broyés au pilon avec une quantité, de plus en plus grande, de silice lavée (1), dilués au 1/10 dans le même liquide (exp. 17, pH 7,65 – exp. 32, pH 7,58) centrifugés 10 minutes à 3.000 tours, et injectés à doses importantes aux vaches productrices de virus. Dès l'élévation thermique à 40°, la lymphe, si possible, et les aphtes sont prélevés et conservés, en fragments de 1 à 3 cm2, soit dans le milieu précédent, à + 4°, soit, mieux, tels quels, à – 20°. La petite dimension de la langue des vaches et la récolte sans abattage, ne permettent d'obtenir qu'une dizaine à une vingtaine de grammes d'aphtes, quantité très suffisante pour les expériences.

La préparation du virus pour l'inoculation au foetus est la même mais la dilution (exp. 26, 50 cc., pH 7,30) doit être filtrée sur disque Seitz EK. Le temps de filtration est inférieur à 20 minutes, à un vide de 30 cm. Hg. Le disque est lavé deux fois à l'eau tamponnée, les 10 à 20 premiers cc. de la solution virulente filtrée (exp. 26, pH 6,75) sont éliminés. Ces précautions permettent de conserver un pH adéquat à la solution (exp. 26, pH : 7,2). Cette filtration écarte les germes figurés qui provoqueraient une infection foetale, et donne une suspension à peu près homogène, débarrassée des grosses particules qui peuvent protéger le virus. Des expériences préliminaires de filtration de virus aphteux ont prouvé que l'utilisation du filtre Seitz EK est préférable à la bougie Chamberland L3 (p. 31).

La quantité d'aphtes broyés varie entre 0,152 gr. et 4 gr. Le filtrat convenablement dilué est inoculé au foetus et à un bovin témoin, à des concentrations variables avec les expériences ; il est dilué, le plus souvent, au 1/10 ou au 1/20, rarement au 1/100 (exp. 15) ou au 1/1.000 (exp. 31). Nous insistons sur ce fait : c'est la même préparation de virus qui est inoculée, le même jour, à quelques heures d'intervalle, au foetus en utérus et au bovin témoin. Les conditions de préparation de la dilution virulente sont donc semblables.

Les dilutions sont faites, à la pipette, en milieu de J.-André THOMAS, à pH voisin de 7,6, aux 1/10, 1/100, 1/1.000..... immédiatement avant les injections.

Titre :

Les virus ont été titrés sur 45 vaches de race bretonne, de 15 à 18 mois, provenant de régions indemnes de fièvre aphteuse, et n'ayant reçu aucune vaccination.

---

(1) La silice commerciale, légèrement acide, doit être lavée à l'eau bidistillée, portée à l'ébullition, puis lavée une deuxième fois à l'eau bidistillée et séchée à l'étuve.

[illegible]

[illegible] Recherches Vétérinaires [illegible] çues (NOCARD & ROUX) en vue de tel[illegible] offrent toutes garanties désirables [illegible] me pour les distributions d'eau et de [illegible]

Pour une même expérience, les animaux [illegible] un par un, dans des boxes désinfectés 72 heures [illegible]ravant à la soude à 4 p. 100. Des palefreniers différents assurent les soins des vaches indemnes [illegible] fébricitantes.

Nous nous sommes attachés à avoir des viru[illegible] départ d'un titre élevé, au minimum 10^{-5}. En [illegible] au point de vue pratique, la Commission d'Etude [illegible] Vaccin antiaphteux réunie à Bâle, en 1948, a concl[illegible] que [illegible] devait être infectieux au moins à 10^{-6}. [illegible] passage [illegible] le titre peut baisser dans les expériences, bien qu'[illegible] quantité supérieure en poids soit obtenue, c'est le cas des [illegible] (10^{-7} à 10^{-5}). Il y a donc intérêt à prendre un titre le plus élevé possible. Quand toutes les conditions de cultures sont satisfaisantes, le titre du virus conserve sa valeur primitive : exp. 13 (10^{-6}), exp. 16 (10^{-6}), exp. [illegible] exp. 10 [illegible] l'expérience 15 n'est pas satisfaisante.

Inoculation au foetus :

La dilution virulente est injectée, par voie intradermique, selon 2 méthodes : seringue, et inoculateur d'une vingtaine d'aiguilles. Dans le premier cas, il s'agit d'injections intradermiques banales, pratiquées [illegible] ment [illegible] Avec l'inoculateur, [illegible] techniques : piqûres intradermiques [illegible] des aiguilles de l'inoculateur [illegible] et piqûres multiples par applications répétées de l'inoculateur (tatouage), frottement de la peau avec l'inoculateur [illegible] permettent d'inoculer, très rapidement, toute la surface du foetus.

Dans la [illegible] des expériences nous avons fait 5 à 8 intra[illegible] on tatoué et griffé la peau.

[illegible]

[illegible]

[illegible] (exp. 13 et 14), ou glucosé à 40 p. 1.000 (exp. [illegible] 12) qui est employé. Dans chaque cas des expériences de [illegible] ont été positives, ce lavage, pourvu qu'il soit exécuté dans [illegible] [illegible] de la culture du virus.

Milieu de perfusion du foetus :

Sang :

Pour nos premiers essais, le sang de bovin défibriné, à [illegible] p. 100 dans le liquide physiologique de J.-André THOMAS (solut[illegible] [illegible] et 3), a été utilisé. En général, les trois parties du liqu[illegible] [illegible] leur incidence sur la culture du virus.

[illegible] tives sur 6.

Glucose :

Le [illegible] de 10 à 40 p. 1.000, 4 essais de culture sont positifs sur 6, [illegible] 2 essais sont positifs pour 3 milieux sans glucose. La prése[illegible] glucose n'est pas indispensable et ne paraît pas favoriser, de façon appréciable, la culture. Il a une action bienfaisante sur [illegible] survie des tissus.

Acides aminés et vitamines :

Pour accélérer la culture, l'addition d'acides aminés, comme [illegible]

L'acide ascorbique a été ajouté, en milieu sanguin, pour [illegible] exp. 27 [illegible]

Sérum :

Il est possible de remplacer le sang par du sérum sanguin. [illegible] milieu.

4 essais, avec des doses moindres de sérum, 13 à 28 p. 100,

n'ont pas [illegible] mais on ne peut tirer aucune conclusion [illegible] d'expériences spéciales : inoculations tardives [illegible] virus (6 à 10 h.) après perfusion de 6 à 7 h.

L'intérêt du sérum est d'éliminer l'hémoglobine du sang qui ne paraît pas avoir une bonne action sur la conservation du virus aphteux.

Peptone de caséine :

La peptone de caséine à 5 p. 1.000, dans le liquide complet de J.-André THOMAS est utilisée dans 3 essais : 22 et 23. Elle n'a de bons effets que pour la perfusion [illegible], mais le milieu de celle-ci a été infecté (peu de pénicilline).

Le même résultat a été obtenu avec la caséine lactique à [illegible] p. 1.000 (perfusion 29) pour laquelle, également une infection est apparue et où le virus a cultivé, bien que son titre ait baissé).

Lait :

Dégraissé et homogénéisé, le lait est substitué au sang. Il entre dans la proportion de 180 p. 1.000 dans le liquide complet de J.-André THOMAS. Il ne donne pas de bons résultats (exp. 31) ; l'action néfaste sur les tissus foetaux (choc lactique) doit être responsable de la destruction du virus.

Liquide physiologique de remplacement :

La solution la plus simple, qui a permis d'obtenir un résultat appréciable, est la solution physiologique de J.-André THOMAS composée de ses 3 parties et de 20 p. 1.000 de polyvinyl-pyrrolidone (exp. 19). Un tel milieu, sans addition de sang ou de lait, permet d'obtenir des mouvements péristaltiques de l'intestin du foetus perfusé.

En résumé, c'est le milieu au sang à 50 p. 100, dans le liquide complet de J.-André THOMAS, renfermant, en particulier, des acides aminés et l'acide ascorbique, légèrement réducteur par l'addition de pyruvate de soude (25 p. 1.000), qui semble le plus apte à la culture du virus aphteux sans altération des tissus foetaux (exp. 27).

Antibiotiques, antihistaminiques :

L'addition de [illegible] à [illegible] U.O. de pénicilline par [illegible] de milieu ne gêne pas la culture (exp. 27, 32). Au contraire, l'addition de 250 mgr.

de N diméthyl [illegible] au cours de la perfusion [illegible] pour la culture du virus [illegible].

Milieux [illegible]iques.

Les milieux au polyvinyl-pyrrolidone, ou au sérum [illegible] dans de rares cas, enrichis d'extraits embryonnaires.

Ces extraits consistent en un broyage (Latapie ou [illegible] de coeur et thymus d'un foetus ovin de 45 à 60 cm., dilué [illegible] p. 100 en liquide physiologique.

Le liquide surnageant après centrifugation d'1/4 d'heure [illegible] 1.000 tours est ajouté, stérilement, en cours de perfusion. [illegible] pouvait penser [illegible] action cardiaque stimulante des cultures [illegible] tissus et la [illegible] du thymus et du virus auraient [illegible] action [illegible] expériences [illegible] 22) sur 6 sont positives, pour les 4 négatives d'autres causes interviennent, et on ne pourra se prononcer qu'après une nouvelle expérimentation.

pH :

Nous [illegible] pH au cours de la perfusion déc[illegible] les rapports [illegible] culture du virus [illegible]. Il fallait [illegible] pH du milieu [illegible] entre 7,[illegible] et un pH [illegible] 7,[illegible] selon les auteurs classiques.

<u>Le pH de dé</u>[illegible] est, en moyenne, de 7,45 [illegible] varie, selon les [illegible]. Le pH moyen des expériences positives [illegible] à 7,95 ; celui des expériences négatives [illegible] entre 7 et 7,8[illegible]. On peut donc concl[illegible] de la neutralité, [illegible]

Le pH le pl[illegible] au cours [illegible], dans la majorité des [illegible]

Cependant [illegible] pH, initialement [illegible] à 6,6 puis est [illegible] à 7,36, la 33ème [illegible] culture du virus [illegible] ront.

Dès le début de la perfusion, le pH s'abaisse rapidement, puis atteint [illegible] qui a cependant une tendance à l'acidité.

Les additions de soude [illegible] physiologique, ou de bicarbonate de soude à [illegible] de certaines perfusion afin d'essayer de conserver [illegible] n'ont empêché ni le milieu de s'acidifier [illegible] le virus de cultiver (exp. 19, 21, 22).

[illegible] après des perfusions de 25 [illegible] variant de 4,7 à 7,72. Il n'y a pas de dif[illegible] le pH moyen des expériences positives (6,5) et [illegible] des expériences négatives [illegible] sont parallèles [illegible] à 7,5 (exp. négatives).

L'infection du milieu fait tomber le pH à un niveau très bas : 6,2 (exp. 30), 5,72 (exp. 29), 4,83 (exp. 26), 4,7 (exp. 22). Cependant dans l'expérience 22 où le pH [illegible] le virus cultive ; il survit dans l'expérience 29, mais les essais 26 et 30 ont été négatifs.

Ces [illegible] le pH ne joue pas un rôle capital en lui-même ; un pH [illegible] alcalin, 7,6, est optimum, mais des pH acides peuvent être tolérés. [illegible] avec de nombreux travaux, notamment ceux de PYL (p. 41).

rH :

Au facteur pH est lié, dans une certaine mesure, le facteur rH [illegible] entre ces potentiels d'oxydo-réduction [illegible] est peut-être plus important que leur valeur absolue.

[illegible] de pH 7,6 et rH 12 sont nuisibles. Pour [illegible] dans les meilleures conditions [illegible], J.-André THOMAS a été entraîné à ajouter aux milieux, de la réductose [illegible] sont contradictoires, mais l'expérience 27, effectuée dans de telles conditions [illegible] résultats.

[illegible]ditions de la [illegible] :

[illegible]sion :

La perfusion [illegible] foetus, au cours de la durée totale de l'[illegible] virus (11 expériences positives sur 23), est préférable à l'incubation à l'étuve après une perfusion de quelques heures (1 exp. positive sur 6), ou sans aucune perfusion (1 positive sur 7).

L'entretien d'une [illegible] est indispensable à la culture du [illegible].

Durée d'incubation :

Dans le [illegible] avec perfusion d'une durée égale à [illegible], le temps moyen de perfusion [illegible] les expériences positives (6)

avec des limites extrêmes de [illegible] et [illegible] h., celui des expériences négatives oscille dans les mêmes temps : durée moyenne de perfusion 31 h. (6 exp.), temps extrêmes 27 et [illegible] h.

Pour la série d'expériences de perfusion suivies d'incubation, les durées de perfusion sont courtes : 6 h.30 à 10 h., soit une moyenne de 7 h.30, et les temps d'incubation relativement longs 25 à 62 h., soit 50 h. en moyenne. 2 expériences ont été positives, l'une pour la courte durée (exp. [illegible], [illegible] h.), l'autre pour la longue durée (exp. 32, 62 h.). 4 expériences de longue durée ([illegible], 62, 62 et 48 h., respectivement exp. 34, 35, 36, 37) ont été négatives.

Ces temps d'incubation [illegible] pas [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] formation d'anticorps, ou la destruction du virus [illegible] de déchets tissulaires acides.

Température :

La majorité des essais de culture a été faite à la [illegible] de 37° (5 positives).

Un écart de 1 ou 2 degrés, en plus ou en moins, [illegible] pas avoir une grande importance (3 positives : 1 à 36°, 1 à [illegible], [illegible] 39°), mais une température élevée, 40° par exemple, ne [illegible] favorable (exp. 15 et 21).

Respiration :

[illegible] le poumon artificiel est le mélange [illegible] gène pur. Les 2 gaz permettent des culture[illegible] mélange respiratoire, et 1 avec [illegible] de l'absence de nocivité des 2 gaz est l'expérience 29 [illegible] tré une survie du virus, et pour laquelle le mélange de CARREL [illegible] 5ème heure de perfusion, par de l'oxygène.

De plus, des expériences préliminaires in vitro sur le virus [illegible] ont démontré l'innocuité [illegible]

Pression circulatoire [illegible]

La pression ([illegible] cm. [illegible] 0,5 cm. Hg en général) et le pouls (80 [illegible] interviennent pour la survie convenable du virus.

Evolution de la perfusion sur la culture du virus :

[illegible] la perfusion, il faut considérer les modifications du [illegible] du virus.

[illegible]

[illegible] rendu [illegible] sang artériel et veineux est physiologique. Le léger brunissement [illegible] [illegible] d'une infection accidentelle qui, d'elle-même, [illegible] le virus.

[illegible] point [illegible]

L'évolution du [illegible] d'être [illegible]

Au point de vue chro[illegible]

[illegible]

[illegible] normal du foetus : nouvel exemple de coexistence de [illegible] survie du foetus et de culture [illegible]

Infection :

[illegible]

[illegible]

[illegible]

un [illegible] Il est surtout visible dans les [illegible]

[illegible]

Rigidité .

La culture, et même la simple survie du virus, paraissent inhibées lorsque le foetus présente une certaine rigidité.

[illegible] de perfusion avec un liquide très alcalin (dans le but de favoriser la culture du virus) [illegible] résultats ont [illegible] aussi, [illegible] au bout de [illegible]

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, il est préférable, pour obtenir une culture satisfaisante, de favoriser la survie des tissus foetaux plutôt que de fournir de bons éléments (pH....) au virus, au détriment du foetus.

Les tissus doivent rester vivants pour permettre la culture. Ce fait confirme pleinement tout ce que l'on sait sur la culture des virus en général.

Lésions générales :

Au cours de la perfusion, des lésions apparaissent, extérieurement, [illegible] sanguines, [illegible] pement du virus. De même l'altération des organes internes, en particulier du foie et de la rate, n'intervient pas. La peau a tou[illegible] est ferme et résistante. Les examens histologiques ont montré que l'épiderme foetal [illegible] les follicules pileux [illegible] infiltré et pycnotique. A noter que [illegible] laquelle les protéines sanguines ont été [illegible] de caséine, certains viscères sont alté[illegible] le virus [illegible] croissance satisf[illegible]

Absence de lésions

La culture du virus ne s'accompagne d'aucune lésion au point d'inoculation. Les foetus 16 et 27, entre autres, ne montrent aucune lésion cutanée.

Au niveau des lèvres, des gencives et de la langue, des décol[illegible] rien.

Résumé

Conditions optima de perfusion

Le foetus (30 à 40 cm.) et le sang doivent être recueillis très tardivement, si possible le matin même de l'opération.

La circulation sanguine du foetus est lavée, à basse pressi[on] avec le liquide physiologique tiède à pH 7,8 de J. André THOMAS

Le milieu de perfusion contient 50 [illegible] 100 de sang défi[illegible] additionné d' [illegible] de pyruvate de soude, de glucose.

Le virus, de passage récent sur Bovin, d'un titre [illegible] faible dilution (10^{-1}), par de multiples injections intradermiques sur la peau du foetus.

Le bain veineux, le mélange respiratoire, une tem[illegible] semblent les facteurs les plus satisfaisants.

A titre d'exemple, l'expérience positive 27, correspondant à ces conditions, sera décrite à la fin de ce chapitre.

[illegible]

Au [illegible] des mouvements péristaltiques et d'une bonne culture du virus, [illegible] homologues [illegible] aucun rapport de cause à effet, mais cette constatation est la [illegible] tissus perfusés.

Les foetus de couleur rosée, ayant le meilleur aspect [illegible] ne sont pas les plus aptes à la culture du virus, au contraire, ce sont les [illegible], avec présence [illegible] d'une circulation certaine, peut-être même hypertendue).

On peut conclure que la perfusion joue un grand rôle dans la culture du virus, en permettant une meilleure survie des tissus.

[illegible] cultures les plus satisfaisants ont été [illegible] les foetus qui, dans de bonnes conditions de perfusion, ont montré des preuves certaines de vitalité : artérioles rouges, veinules bleues (ex. exp. 16), [illegible] (ex. exp. 16), [illegible], griffades très apparentes (ex. exp. 27), [illegible] péristaltiques intenses (ex. exp. 32).

Récolte du virus de culture :

Le foetus est [illegible] stérilement dès sa sortie de la chambre-[illegible] techniques de préparation sont employées

- les zones d'injections intradermiques et leur périphérie sont prélevées (2 cm^2 env.) et divisées en 2 parties, l'une pour l'inoculation au Bovin, l'autre

en vue d'un passage ultérieur sur foetus. Le reste de la peau [illegible]
[illegible]
3 à 4 cm². Certains de ceux-ci, prélevés au hasard, sont ajoutés aux deux parts précédentes dans la proportion d'1/3 environ;

- toute la peau inoculée est recueillie, découpée grossièrement, pesée diluée à 50 p. 100 en liquide de J.-André THOMAS, pH 7,6, et broyée au Turmix pendant 5 à 10 minutes.

Titrage du virus foetal :

Qu'il s'agisse de l'une ou de l'autre des techniques de prélèvements, 1,5 à 2 gr. de peau foetale sont finement broyés au mortier, avec ou sans [illegible] alable au Turmix).

Le broyat est dilué au 1/10 au liquide de J.-André THOMAS, pH 7,6 centrifugé à [illegible] légèrement opalescent, est inoculé, par voie intradermique, dans la langue d'un bovin neuf, à diverses dilutions.

Autant que possible il est éprouvé une dilution par bovin, cependant, par économie, la méthode des dilutions multiples sur une seule langue [illegible] est utilisée. Cependant, dans les titrages, il arrive que les aphtes primaires n' [illegible] met pas de déduire le titre.

Pour chaque dilution, 1 cc. est réparti en 6 à 8 intradermiques en ligne longitudinale. La formation des aphtes primaires a généralement lieu entre 16 et 30 h., et la température s'élève à plus de 40° entre 36 et 48 h.

Les cobayes sont peu utilisés pour le titrage des virus de culture, [illegible] d'adaptation, après passage sur la peau foetale, la préparation du virus [illegible] coussinet plantaire non pigmenté de la patte gauche du cobaye. 2 à 3 cobayes reçoivent une même dilution.

Résultats : (v. tableau du bilan des expériences p. 364)

D'après ce tableau, dans le cas des perfusions et incubations [illegible] le virus maintient sa virulence et même [illegible] donnons un bref résumé :

Exp. 11 : virus de départ de titre insuffisant (1/5)
21 : température de culture élevée, plus de 40°
23 : milieu à base de peptone de caséine, arrêt en [illegible]

Foetus inoculés		Virus	Modes de perfusion et d'incubation	[illegible]	Cultures de virus positives
36	30	primo-[illegible]	18 perfus. et incub. simultanées	12	11
			[illegible] perfus. [illegible] à l'incubation	5	2
			7 incub. sans perfusion	3	1
	6	virus de passage	5 perfus. et incub. simultanées	5	1 ?
			[illegible] perfus. préalable à l'incubation	1	0

Exp. 16 : [illegible]
30 : milieu à base de caséine et infection
31 : milieu à base de lait.

Sur les 7 cas d'incubation sans perfusion, la culture est obtenue une seule fois sur 3 essais, les 4 autres foetus se sont altérés (exp. 13quater) ; lors de l'incubation secondaire, à quelques heures de perfusion, 2 cultures sur 5 sont positives.

[illegible] deux groupes d'expériences [illegible] admettre que la perfusion [illegible] toute la durée de l'incubation, ce qui [illegible] permet la survie cellulaire [illegible] de virus.

[illegible] expériences positives sont résumées dans le tableau N° [illegible]

N°	Sexe	Milieu	Durée perfus. et incubat. en heures	pH le + acide au cours de la perf.	Infection	Virus de départ			Titre du virus de culture
						Type	Quantité inoculée	Titre	
10	♂	sang	23	6,15	0	0	10 cc. à 10^{-1}	10^{-5}	5.10^{-5}
12	♂	sang	27	6,2	0	0	2,25cc. à 2.10^{-1}	? < 2.10^{-1}	10^{-1}
13	♀	sérum	48	6,75	0	0	6,75cc. à 10^{-1}	10^{-1} – 10^{-6}	10^{-1}-10^{-6}
14	♀	sang	31	6,6	0	0	2 cc. à 3.10^{-1}	? < 10^{-4}	10^{-4}
15	♀	sang	50	6,9	0	[illegible]	3 cc. à 10^{-1}	10^{-4}	0 mais 1 bov. sur 2 est vacciné
16	♀	sang	31	7,2	[illegible]	0	2 cc. à 10^{-1}	10^{-6}	10^{-6}
18	[illegible]	[illegible]	35	[illegible]	0	0	[illegible]	–	10^{-5} [illegible]
22	♀	peptone de caséine	30	4,7	[illegible]	–	[illegible]	?	10^{-5}
25	♀	sang	31	7,72	0	0	3,25 cc. à 10^{-1}	0 10^{-1}	10^{-5}
27	♀	sang	40	7,26	0	0	2 cc. à 10^{-1}	10^{-3}	10^{-5}
29	♂	caséine	43	5,72	[illegible]	0	2,5 cc. à 10^{-1}	10^{-3}	10^{-1}-10^{-4}

Tissus de culture :

La culture du virus ne s'effectue que dans les tissus inoculés et réceptifs : muqueuse buccale, langue, gencives, mufle, peau de la surface du corps, testicules. Le virus ne diffuse pas dans les régions non inoculées : peau et organes internes (exp. 10, 14). Il est nécessaire de multiplier les points d'inoculation si l'on désire obtenir une récolte importante. Le milieu de perfusion n'acquiert aucune virulence.

Quantité récoltée :

Les tissus inoculés sont pesés. Le poids est très variable, selon les essais, il est proportionnel au territoire inoculé.

Les muqueuses buccales du foetus sont d'un rendement médiocre. Le rapport de la quantité de virus inoculé, à celle obtenue, est faible en raison de la petite surface disponible.

L'inoculation de la peau du corps est suivie d'une culture beaucoup plus importante ; elle est positive dans 11 expériences sur 12. Toute la surface de la peau peut être inoculée avec succès. La région de la tête a une peau très épaisse, elle a donc été exclue en raison du broyage ultérieur difficile et du lest inutile, non proportionnel au poids du virus.

Au titre expérimental, une récolte importante n'a pas été recherchée, et une partie seulement de la surface de la peau est inoculée, au maximum 1/2 foetus ; dans ces conditions, la récolte varie de 9 gr. (exp. 16) à 141,371 gr. (exp. 29). Elle peut être beaucoup plus grande si toute la surface du foetus est inoculée. Par exemple, un foetus de 58 cm. pourrait donner 550 gr. de peau utilisable.

Titre :

Le titre généralement bas de nos virus d'inoculation est dû à la filtration sévère sur disque Seitz EKI, malgré cette circonstance défavorable, il est conservé dans 3 expériences (12, 16, 27), augmenté dans 3 (10, 14, 25), diminué dans 2 (13, 29), aboli, mais toujours antigénique, dans une (15). Pour les expériences 19 et 22, les virus de départ n'ont pas été titrés, mais les virus de culture ont un titre élevé, respectivement : 10^{-6} et 10^{-5}.

Si les conditions sont satisfaisantes, le virus conserve son titre de départ : 10^{-6} (exp. 16), 10^{-5} (exp. 27). Pour l'expérience 12, le virus témoin au

[illegible] en milieu [illegible] il ne [illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible] des perfusions [illegible] d'éthine [illegible]
[illegible] respectivement [illegible]
[illegible]
[illegible] pour [illegible] des dilutions
[illegible]
[illegible] après [illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible] en effet, [illegible]
[illegible] de départ [illegible]
[illegible] la formation [illegible]
[illegible] de la culture [illegible]
[illegible] la teneur [illegible]
[illegible]
[illegible] des perfusions [illegible]
[illegible]

[illegible]

[illegible] multiplication du virus : l'exemple de l'expérience 27 [illegible] le virus inoculé au foetus est actif, sur [illegible] à 10^{-6}, il y a donc 5.000 unités virulentes dans 1 cc. de suspension de virus dilué au 1/20. [illegible] il a été injecté 2 cc. au 1/20, soit 10.000 [illegible] perfusion, on a recueilli 40 gr. de peau de foetus, cette peau est active à 10^{-5}, mais non à 10^{-6} [illegible] le virus ne s'était pas multiplié, on devrait [illegible] le virus actif à 1/250 or il est actif à 10^{-5}, il s'est [illegible] multiplié 400 fois. Nous n'avons pas toujours eu la possibilité de titrer le virus de départ, par suite du prix de revient des bovins. Dans [illegible] expériences, le taux des multiplications [illegible] fois, mais il s'agit d'expériences de laboratoire et seulement une petite partie du foetus a été inoculée et recueillie ; ainsi, dans l'exp. 29, pour 2 cc. d'une suspension de virus dilué au 1/10, soit 0,20 gr. d'aphtes actif à 10^{-5}, inoculé au foetus, on recueille 141,371 gr. de peau virulente à 10^{-4} (multiplication de 7 fois). Dans l'expérience 32 : 1,2 cc. [illegible] au 1/10, soit 0,12 gr. d'aphte d'un titre de 10^{-7} a permis d'obtenir 33,513 gr. virulents à 10^{-6} (multiplication de 25 fois). Il est certainement possible, en inoculant toute la surface du foetus, de recueillir quelques centaines de grammes de peau virulente par foetus et d'avoir un taux de multiplication supérieur à 400.

Virulence :

Chez les bovins, l'évolution de la fièvre aphteuse due au virus de culture est identique à celle produite par le virus d'aphtes de bovins : mêmes symptômes, mêmes lésions. L'incubation est de même durée (24 h.) [illegible] les inoculations de virus témoin et virus de peau [illegible]. Le clocher thermique est aussi élevé : il [illegible] à 41° et suit une courbe classique. L'appari[illegible]

[illegible]

[illegible] à la suite du titrage [illegible], nous avons trouvé des lé[illegible] à celles observées, parfois, au cours d'infection naturelle : le coeur était parsemé de petits points blancs et il renfermait un [illegible] à celui déjà décrit.

[illegible] inoculation du virus de culture foetale, [illegible] est suivie d'une fièvre aphteuse de type [illegible]

Adaptation :

Le passage du virus sur foetus en survie ne modifie pas les affinités du virus aphteux ; il maintient son dermotropisme, il n'acquiert pas de nouvelles propriétés. Son adaptation au Cobaye n'est pas favorisée, par exemple, la souche O Pontoise qui ne passait pas sur cobaye, même au 1/10, lors de l'expérience 10 (2 cobayes négatifs sur 2) ne donne qu'un aphte primaire sur 2 cobayes après passage sur peau de foetus, malgré deux passages de cet aphte ce virus ne réussit pas à provoquer de lésions généralisées ; mêmes résultats dans les expériences 23, 27 et 28. Remarquons que les cobayes ne sont pas, par la suite, immunisés puisqu'ils sont réceptifs à une inoculation virulente de même type, une quinzaine de jours après l'essai de titrage.

Toutefois, dans l'expérience 27, l'adaptation au Cobaye semble favorisée si les cobayes sont sensibilisés préalablement par l'injection de sérum bovin (étude de RINJARD). En effet, le virus témoin au 1/20 ne passe pas sur cobaye sensibilisé alors qu'après culture du foetus, il donne une fièvre aphteuse généralisée à un cobaye sensibilisé ; un 2ème, puis un 3ème passage ne permettent pas d'augmenter cette adaptation au Cobaye. Le détail de ces inoculations est donné dans le résumé de l'exp. 27.

Pouvoir immunisant :

Les bovins ayant fait une fièvre aphteuse généralisée, après l'inoculation du virus de culture, sont immunisés aussi bien que ceux ayant eu la maladie après inoculation de virus d'aphtes : le pourcentage d'apparition d'aphtes primaires, à la suite de l'épreuve, est identique et l'immunité est aussi solide.

Dans le [illegible] n° [illegible], nous avons résumé le résultat des é-[illegible] [illegible] ayant servi au titrage des virus témoins et de culture de l'expérience [illegible].

[illegible]

Il [illegible] la peau dans laquelle le virus [illegible] expériences faites en [illegible], 2 cc. d'un broyage de [illegible] 17 jours à -20° (exp. [illegible]) [illegible] n virulente après incu-[illegible] (exp. 33) et, simultanément, [illegible] sur cobaye), ont [illegible] [illegible] cobayes, pour chaque [illegible] avec 48 h. de retard [illegible] le virus, par voie in-[illegible]

[illegible] culture

[illegible] Vallée-Schmidt-[illegible]

[illegible]

500 cc. d'hydroxyde d'aluminium à [illegible]

[illegible]

[illegible] par voie sous-cutanée [illegible]

[illegible] virus à 2.10⁻⁴, par voie [illegible]

d'aucun symptôme de [illegible]

[illegible]

Le virus est inoculé sur la peau des foetus [illegible] sortie de l'utérus et déposé dans une cuve [illegible]

Sur 4 essais [illegible] positif [illegible]

[illegible]

foetus est actif à 10⁻⁴, et le virus de culture titre [illegible] (peau) et 10⁻⁶ [illegible]

[illegible]

[illegible], les foetus, après [illegible] pendant quel-ques heures [illegible]

[illegible]

[illegible]	N° [illegible]	[illegible]	[illegible]		Date	ÉPREUVE DE L'IMMUNITÉ		Observations
			[illegible]	[illegible]		Quantité et dilution du virus témoin	Résultats	
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]		[illegible]	2cc. à 2.10⁻²	0	
[illegible]	[illegible]	[illegible]		+	[illegible]	2cc. à 2.10⁻²	0	
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]		[illegible]	2cc. à 2.10⁻²	0	
[illegible]	[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]	2cc. à 2.10⁻²	0	
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]		[illegible]	2cc. à 2.10⁻²	+	
[illegible]	[illegible]	[illegible]		+	[illegible]	2cc. à 2.10⁻²	0	
[illegible]	[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]	2cc. à 2.10⁻²	+	
	[illegible]				[illegible]	2cc. à 2.10⁻²	+	[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible] témoin et de culture est équivalente : [illegible] l'épreuve virulente.

[illegible] de culture non suivie de l'apparition de la [illegible]

[illegible] (O Vallée) n'est pas modifié par la culture sur foetus, [illegible] autres expériences.

[illegible] culture sur foetus en [illegible]

[illegible]

Essais de passages de virus de foetus à foetus :

Les 6 essais de 1er passage faits à partir de culture virulente sur peau de foetus perfusés (exp. 17, 19, 20, 24, 28, 33) ont échoué. Ce résultat peut tenir à différentes causes : mauvaise conservation du virus dans la peau foetale, présence d'anticorps, insuffisance rapidité de repiquage du virus (dû au fait que nous n'avons disposé que d'un seul appareil à perfusion). La perte de l'activité du virus conservé dans la peau foetale de culture est rapide, par exemple, la peau de l'exp. 32 active à 10^{-6} (vache 241) dès le prélèvement, n'est plus active si elle est conservée 14 jours à -20° (vache 825).

Cet échec, grave au point de vue doctrinal, ne doit pas entrer en ligne de compte au point de vue pratique, car il est certainement plus intéressant d'avoir, en vue de la préparation des vaccins, un virus de passage récent sur un bovin, donc "rajeuni", pour inoculer les foetus, qu'un virus de nombreux passages sur foetus qui a pu modifier certaines de ses qualités et acquérir des adaptations différentes. Ce passage n'entraîne la dépense que d'un bovin pour l'inoculation de plus de 200 foetus.

A titre d'exemple, nous ajoutons le protocole d'une expérience de culture montrant le travail nécessaire et les résultats que l'on peut obtenir.

<u>Protocole de l'expérience 27</u> :
(1 - 23 Juin 1948)

Préparation du foetus :

- abatage de la vache gravide et prélèvement de l'utérus vers 10 h.
- transport au laboratoire, mise à l'étuve à 10 h.30
- extraction en salle stérile du foetus : ♀ 37 cm. à 11 h.40 (10 minutes)
- mise en place de la canule artérielle, section des 2 veines ombilicales, foie en partie réséqué, large débridement abdominal, ouverture de l'épiploon,

[illegible]

Solution 1 :	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Solution 2 :	Glucose	40 gr.	[illegible]
	[illegible]	0.5 gr.	[illegible]
Solution 3 :	[illegible]	[illegible]	[illegible] filtrati[illegible]
	Acide ascorbique	0.003 gr.	[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible] erreur [illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	arret de la perfusion [illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible] ... [illegible]ologique des [illegible]

[illegible]

[illegible]ement de la peau inoculée

[illegible] 990 gr. dont une partie est mise en milieu [illegible]

[illegible]

[illegible] (→ 33[illegible])

[illegible] (→ 33[illegible])

[illegible]

[illegible]

[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

[illegible]

TABLEAU N° [illegible]

	N° cob.	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	5
Virus témoin	[illegible]	[illegible]	[illegible]	+++	+++	+++
Anciens virus témoin exp. 27	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Anciens peau foetus 27	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

D'après ce tableau n° 35 les cobayes n'étaient pas [illegible] [illegible] 1 qui a reçu de la peau foetale.

cobayes sensibilisés : le 24/5/48, 3 cobayes re[illegible] [illegible] à 60° pendant 30 m.
Le 3/6/48, nous injectons les 3 cobayes avec du virus té[illegible] au 1/20, de la peau foetale au 1/20, du milieu de perf[illegible]
Les résultats sont donnés dans le tableau n° 36.

TABLEAU N° 36

	N° cob.	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	5	6	7	8	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Virus témoin	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	00	00	00	00	00	00	00	00
[illegible] tus 27	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	++A	++A	++A
Milieu de perfus. 27	538	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00

[illegible] le cobaye sensibilisé ; son aphte [illegible] inoculé à 2 cobayes (tableau n° 37)

TABLEAU N° 37

	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	7	8
[illegible]	[illegible]9 [illegible]0	+0 00	+0 +0	+0 ++	+0 ++	+0 ++A	00 ++A	00 ++A	00 ++A

[illegible] à partir d'un aphte [illegible]

[illegible]

[illegible]	[illegible]			[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]					
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

En conclusion :

- le virus témoin est actif à 10^{-2} sur [illegible] inoculée et incubée (42 gr.) est acti[illegible]

- le virus témoin n'est pas actif [illegible] sensibilité.

- [illegible], après culture, est active au 1/20 sur [illegible] neutr[illegible] [illegible] Le passage sur veau foetale a confié, dans une [illegible]

- [illegible] n'est pas virulent [illegible] le coq [illegible]

- [illegible]

[illegible]

[illegible]fication de l'agent pathogène [illegible] les conditions de

rables sont les suivantes : [illegible]
du foetus, du sang, et de la mise en survie ; lavage de la circulation foetale par une solution saline de pH 7,55 ; inoculations multiples de virus de passage récent ; perfu- [illegible]
complet de J.-André THOMAS et de sang ; bain du foetus en milieu veineux ; mélange respiratoire oxygéné ; température 36° ; 46 h. de perfusion et d'incubation.

La bonne vitalité des tissus du foetus, prouvée par les cultures de tissus _in vitro_ et la présence de mouvements péristaltiques, est un facteur favorable de la culture du virus, l'oedème ne nuit pas, au contraire. La suspension virulente doit être faite avec un virus de passage récent sur Bovin et fraîchement prélevé, il est dilué (1/10 à 1/100) en liquide tamponné à pH voisin de 7,6.

Si ces conditions générales sont remplies, lors des [illegible]
peau de foetus bovin, en dépit de certaines irrégularités, le virus maintient sa virulence, ou même l'accroît : la quantité de virus, à titre égal, est nettement supérieure à celle inoculée : la multiplication peut atteindre 400 fois. Il est possible d'obtenir quelques centaines de grammes de peau virulente de titre 10^{-5}, 10^{-6}. Le virus cultive dans les régions inoculées : muqueuses de la région buccale et peau du corps, la culture ne semble pas s'accompagner de lésions macroscopiques. Le virus ne diffuse pas dans les régions non inoculées : peau et organes internes, ni dans le milieu de perfusion.

Les pouvoir pathogène et immunisant, de même que la spécificité des types du virus de culture ne sont pas modifiés pour les bovins.

La préparation d'un vaccin avec le virus de culture, selon la formule VALLÉE-SCHMIDT-WALDMANN est possible.

Les essais de culture sur foetus non perfusés ou après une courte perfusion, ne sont pas satisfaisants : les tissus foetaux doivent avoir conservé leurs caractères vivants. Les passages du virus de foetus à foetus ont échoué, peut-être en raison de la mauvaise conservation du virus dans la peau.

[illegible] encourageants, mais [illegible] une exigent un travail [illegible] onnel nombreux et [illegible] le titrage [illegible] renouveler [illegible] tures typé- [illegible]

[illegible] pas définitives, mais le [illegible] ssent prouver que cette nouvel[illegible] [illegible] ront rendre quelques ser[illegible] [illegible] permettre la culture d'[illegible]

C) CULTURES *IN VITRO* en MILIEUX ULTRAFILTRES ou DEPROTEINES

INTRODUCTION : Cultures en sérum ultrafiltré (méthode de SIMMS & SANDERS)

Le sérum ultrafiltré est débarrassé des grosses molécules du sérum entier (anticorps et facteurs facteurs de dégénérescence cellulaire ; il perd sa spécificité d'espèce et sa spécificité biologique. SIMMS (1936), puis SIMMS & STILLMAN (1937) ont montré que le sérum ultrafiltré contient, entre autres substances, le facteur A qui active, *in vitro*, le développement des tissus adultes et qui, de plus, semble essentiel pour la survie des cellules vivantes. Le facteur A est un acide d'une très petite molécule qui passe à travers les membranes de cellulose imperméables aux protéines. En solution neutre, il résiste à une température de 100°, mais est rapidement détruit par la chaleur en solution acide ou alcaline.

Le sérum entier et les tissus contiennent le facteur B, responsable de la dégénérescence graisseuse cellulaire et des dépôts de graisse au niveau des artères. Ce facteur B nuit aux cellules de tissus *in vitro* ; il est éliminé par l'ultrafiltration du sérum et les expériences prouvent que les cultures sont meilleures avec le sérum ultrafiltré. Il existe, dans le sérum un facteur anti A (SIMMS & SANDERS, 1942).

Préparation du sérum ultrafiltré :

Il est difficile d'obtenir le sérum ultrafiltré. En Amérique, certains Instituts sont spécialisés dans sa préparation, mais le prix de revient est important en raison de l'appareillage, de la fabrication de grandes membranes de collodion et de la lenteur de l'ultrafiltration ; 1500 cc. de sérum donnent 750 cc. d'ultrafiltrat en 6 à 7 h., à la pression de 60 cm. Hg., et 1.025 cc. en 20 h. Il y a toujours 20 p. 100 de perte. L'ultrafiltrat doit être clair comme de l'eau, non coloré et ne pas contenir de protéines. Si besoin est, il doit être de nouveau ultrafiltré. Après sa récolte, l'ultrafiltrat est additionné de rouge de phénol (1 mgr. pour 100cc), son pH est ajusté à 7,2 - 7,4 par CO_2 ; il est stérilisé par passage sur filtre en verre d'Iéna (5/3). Les filtres Berkefeld et Seitz sont éliminés, car ils provoquent une certaine toxicité. L'autoclavage détruit, en grande partie, l'activité stimulante du facteur A. A défaut de filtre en verre, on peut stériliser l'ultrafiltrat, en petite quantité, à 100° pendant 10 m., ou à 80° pendant 30 m. A l'air, le sérum s'alcalinise rapidement ; le pH est réajusté et stabilisé à 7,2 par introduction de CO_2 dans l'embouchure des flacons. Ceux-ci sont toujours conservés fermés par des bouchons de caoutchouc et stockés en chambre froide ; le contact du sérum avec le bouchon de caoutchouc, souvent toxique, doit être évité.

[illegible]

ultrafiltré. Au moment de l'emploi, le pH peu[illegible] fié par addition de CO_2, par exemple, en [illegible] 5 p. 100 de CO_2 ; le pH reste à 7,4. Le rouge [illegible] permet de contrôler, à tout moment, le pH. Pour [illegible] cultures, le sérum ultrafiltré peut être dil[illegible] fois en solution saline physiologique (p. 244) [illegible] elle-même dans des flacons bouchés pour éviter [illegible] nisation par départ de CO_2.

Culture des virus en sérum ultrafiltré.

L'emploi du sérum ultrafiltré, exempt de protéi[illegible] dosables, comme milieu liquide pour les cultures de [illegible] rus dans les cultures de tissus est dû à JUNGEBLUT & SANDERS (1937), SANDERS (1939, 1940), MOLLOY (1940), SIMMS & SANDERS (1942). Divers virus ont été ainsi cultivés : les virus de la lymphogranulomatose, de l'e[illegible] [illegible] lite, et des souches Est et Ouest de l'encéphalomyélite équine.

SIMMS & SANDERS (1942) ont montré tout l'intérêt de la composition rigoureuse du milieu liquide par [illegible] port aux tissus et au virus.

Le sérum ultrafiltré de bovin (1 partie) est dilué en liquide physiologique de SIMMS (2 parties), fortement tamponné (p.   ) dont le pH (7,5, 7,6) est réajusté avec CO_2 à 10 p. 100, lors de l'ouverture des flacons. Le pH doit être contrôlé constamment par le rouge de phénol [illegible]

[illegible] finement broyé, est, suivant les virus, du cerveau d'[illegible] bryon de souris, de cobaye ou de poulet, de la coelle [illegible] sense de mammifères, de la membrane chorio-allantoïde [illegible] poulet. Le procédé est étudié dans ses plus petits détails : rapport de volume entre les morceaux de tissus [illegible] liquide de culture, rapport entre le volume de la [illegible] et celui des flacons (par exemple, des flacons d'Erlenmeyer de 500 cc. renfermant 125 cc. de milieu, conviennent bien à la culture du virus de la poliomyélite murine), rapport du volume d'air au volume liquide, fermeture des flacons ....

La température d'incubation est variable avec les virus : 35°, 37°, ou température du laboratoire. Le nombre de passages peut être aussi nombreux qu'avec les [illegible]
[illegible] de THEILER de la souris (PARKER & HOLLENDER, 1945)
[illegible] virus cultivés atteint 10^{-7} (virus de l'[illegible] [illegible]lite équine est cultivé sur embryon de pou[illegible] [illegible] de 9 jours, SANDERS & MOLLOY, 1940).

HUANG (1947), en comparant les résultats de la culture du virus de l'encéphalomyélite équine, *in vivo*, par inoculation intracérébrale à la souris, et la culture, *in vitro*, par la méthode de [illegible] rieurs, la méthode est plus sensible et plus économique, elle permet d'étudier des virus humains non transmissibles aux animaux.

BOYNTON réalise (1946) la culture du virus de la peste porcine sur sérum de porc ultrafiltré (25 cc. pour 80 cc. de solution physiologique). Il n'emploie pas le sérum de boeuf, car le virus pesteux porcin n'y survit pas plus de 2 passages. Le milieu est stérilisé par filtration, réparti par 15 cc. dans de grands tubes à essais de 200 x 25 mm., puis ajusté à pH 7,4-7,5.

Le tissu de culture est de la moelle osseuse rouge : 2 gr. sont placés, aseptiquement, dans une boite de Pétri, avec environ 8 cc. de milieu ultrafiltré, et coupés finement. Le tissu osseux est éliminé et 6 gouttes de la suspension cellulaire sont ajoutées à 15 cc. de milieu, pour chaque tube à essai ; ces tubes sont mis à 37°, pendant une nuit, pour vérifier leur stérilité.

Le premier ensemencement est pratiqué à partir de la moelle osseuse d'un porc atteint de peste. Les tubes sont placés à 37° pendant 3 jours, puis entreposés à 4°, ou repiqués ; dans ce cas, 0,5 cc. du liquide de culture sert d'ensemencement pour les tubes neufs. Il est réalisé 24 passages dans une première série, puis 89 dans une 2ème. Chaque repiquage, jusqu'à la 52ème génération, est virulent pour 2 porcs sur 2 inoculés (réaction thermique, symptômes cliniques et lésions typiques à l'autopsie). Au 7ème passage, 2 cc. de virus sont actifs à la dilution de 10^{-9}. Après le 52ème passage la virulence s'atténue, les porcs présentent peu de symptômes mais ont une élévation thermique et sont immunisés. Dans une autre série d'expériences, BOYNTON ajoute 1 cc. de solution de cystéine (0,05 mgr.) aux 15 cc. de milieu en sérum ultrafiltré, contenant déjà 6 gouttes de suspension cellulaire ; cette addition semble stimuler la virulence de la culture. Un vaccin préparé à partir du virus de culture, atténué par exposition aux rayons ultraviolets, donne des résultats favorables : sur 8 porcs vaccinés, 6 survivent au test d'immunité par injection de sang virulent, alors que 5 porcs témoins, sur 6, meurent. Des essais d'atténuation du virus de culture par l'eucalyptol, le formol et le cristal-violet, sont moins démonstratifs.

Le sérum de porc immunisé peut être utilisé pour la culture, puisque l'ultrafiltration empêche le passage des anticorps. Les essais prouvent que la virulence des cultures, faites dans ces conditions, n'est pas considérablement diminuée. Le sérum obtenu aire- [illegible] & WALKER (1948) ont pu examiner, au microscope électronique, le [illegible] cellules de moelle osseuse et le purifient facilement par passage dans des solutions [illegible] nées, et précipitation par le sulfate

d'ammonium, en vue de l'examen électronique.

Pour l'isolement des souches sur le terrain et leur transport, SANDERS & HUANG (1944) ont imaginé des milieux "portatifs" : ce sont les tubes bouchés au caoutchouc renfermant des tissus d'embryons de poulet hachés dans 2 cc. de milieu liquide (1 partie de sérum ultrafiltré et 2 parties de solution physiologique). Ces tubes peuvent être transportés facilement, et ensemencés, dans la pratique rurale, à partir du cerveau de chevaux suspects d'encéphalomyélite.

On peut ajouter au milieu liquide une solution de sulfadiazine qui évite les contaminations. Les tissus restent vivants 55 jours à 25° (± 7°), 28 jours à 37°.

L'intérêt de la culture des virus, dans les milieux ultrafiltrés, est la pauvreté en protéines étrangères au virus de la suspension virulente, par comparaison avec les cultures sur oeufs ou sur tissus, de plus leur stabilité permet une longue survie des virus.

Culture du virus aphteux en sérum ultrafiltré :

Au point de vue de la culture du virus de la fièvre aphteuse, nous avons trouvé, dans la bibliographie, les travaux de FRENKEL & DUNNE (1949), de [illegible], DUNNE, EICHHORN & [illegible] ([illegible]) inspirés de la méthode sur épithélium lingual de FRENKEL (1947).

FRENKEL & DUNNE cultivent, dans des flacons d'Erlenmeyer de 100 cc., les souches hollandaises de virus (10 cc. à 10^{-1}) sur des fragments d'épithélium de langue (18 à 24 gr.) dans le milieu de [illegible] ([illegible] cc.) contenant 20 p. 100 de sérum de boeuf ultrafiltré (1). Les cultures sont aérées par un barbotage de carbogène (2 cc. par minute). Après incubation de 24 h. à 37°, le pH s'abaisse de 7,4 à 6,8.

Les auteurs américains ne réussissent pas à cultiver la souche mexicaine de virus A Vallée par cette méthode, peut-être, pensent-ils, en raison du faible volume d'atmosphère au-dessus des cultures, et des contaminations. Par contre, ils ont obtenu [illegible] passages successifs avec des virus titrant [illegible] et [illegible] séries de cultures positives pendant [illegible] passages, par l'emploi de flacons de Roux contenant [illegible] gr. de tissus et 100 cc. de milieu de culture (dont [illegible] p. 100 de sérum de boeuf ultrafiltré). Le milieu est ainsi réparti en couche mince ; il est ensemencé avec [illegible] cc. de solution virulente. L'atmosphère, au-dessus des cultures, est maintenue constante

---

(1) Leur sérum ultrafiltré provient de : Microbiological Associates Post Office, box [illegible], Bethesda, 14, Maryland

[illegible] sérum [illegible] virus [illegible] le milieu de [illegible] sérum [illegible] amidé [illegible] par [illegible] environ [illegible] il est supérieur [illegible] plus de virus si l[illegible]

[illegible]

[illegible] sulfate [illegible] structure [illegible] il est nécessaire de [illegible]

[illegible]

[illegible] précisi[illegible] avec [illegible]

[illegible]

[illegible] virus aphteux en liquide [illegible]
[illegible] déprotéiné (Méthode de J.-André THOMAS,
Louis et Hélène SALOMON, J.-Paul THIÉRY)

Les cultures sont faites sur pulpe de peau de foetus de vache, en liquide amniotique déprotéiné et [illegible] fié, transformé ainsi en un équivalent d'ultrafiltrat. L'emploi de la peau de foetus de vache n'est pas nouv[illegible] en effet, nous avons vu que [illegible] avait, le premie[illegible] utilisé la peau de foetus de mammifères artiodactyles. Il a fait, également, quelques essais de culture en liquide amniotique bovin filtré.

LE ROUX, ARALBURD ont mis en évidence la virulence du liquide amniotique de vache et de cobaye infectés. L'originalité de la méthode que nous exposons tient à l'emploi du liquide amniotique déprotéiné.

La composition et les propriétés du liquide amniotique varient avec l'âge du foetus. Le liquide amniotique peut être prélevé stérilement, alors qu'il est encore limpide, dans les utérus contenant de jeunes foetus (2 [illegible] 4 mois). Il est possible d'en recueillir au moins 2 à 3 litres dans un utérus gravide de 3 mois. Son pH est légèrement alcalin (7,8) ; il se conserve plusieurs m[illegible] J.-André THOMAS & J.-Paul THIÉRY, par une méthode simp[illegible] (à publier) transforme le liquide amniotique brut en le débarrassant de ses protéines et en le purifiant. Il [illegible] possible de préparer à volonté, et en quantité, une g[illegible] d'équivalents de dialysats ou d'ultrafiltrats de rich[illegible] ses différentes, ne donnant pas de précipitation avec [illegible] acides trichloracétique et sulfosalicylique. Les liqu[illegible] trop appauvris en substances minérales notamment, ne p[illegible] mettent pas de cultiver le virus aphteux, tandis que le[illegible] liquides suffisamment riches mais déprotéinés fournissent une culture virulente, même s'ils ont été chauffés à 60° pendant une heure.

Le tissu de culture est de la peau prélevée sur des foetus bovins de petite taille (30 à 40 cm.). Les grands [illegible] puis finement pulpés au hache-viande. La peau peut [illegible] conservée quelques jours au froid (2 à 4° C.).

La composition des cultures est simple : 1/10 de [illegible] pe de peau, 1/10 de solution virulente et 8/10 de liq[illegible]

amniotique purifié : on peut ajouter, pour plus de commodité, un antibiotique comme la pénicilline G (1 000 U.O. pour 10 cc. par ex.). Le liquide amniotique traité permet de concentrer fortement les fragments de tissus. Pour la mise en culture, il a été utilisé un virus aphteux O de haute virulence pour le bovin (actif à la dilution de 10−8) et passant facilement sur le cobaye (actif à 10^{-4}). Dans le premier flacon de culture, la dilution virulente est de 1/500 ; cette semence initiale serait elle-même diluée 10 fois à chaque passage ultérieur s'il n'y avait pas culture. En effet, pour les repiquages, les cultures sont centrifugées, les culots de centrifugation sont broyés et dilués dans le liquide surnageant, c'est-à-dire leur propre liquide de culture ; le broyat ainsi obtenu est inoculé au 1/10 aux sub-cultures. Les cultures d'entretien de la souche sont de 10 à 20 cc. en fiole conique. L'incubation dure 48 h. à la température de 36° C.

La virulence des cultures est éprouvée, par inoculation intradermique du broyat dans le coussinet plantaire du cobaye. Les cultures des 4 premiers passages ont toutes communiqué, au cobaye, une fièvre aphteuse généralisée, de même que les cultures entretenues sur liquide céphalo-rachidien (p. 397) et passées du [illegible]ème au 30ème passage en liquide amniotique purifié. Un titrage sur cobaye (tableau n° 39) fait au 30ème passage a montré que le virus était toujours actif à la dilution de 10^{-3} et, parfois même, à 10^{-4}.

TABLEAU N° 39

Dil. du virus	N° Cob	1	2	3	4	5	6	7
10^{-1}	349	+0	+-	[illegible]	++A	++A	++A	++A
	350	00	0	00	00	00	[illegible]	[illegible]
10^{-2}	351	+0	++A	++A	++A	++A	++A	++A
	352	+0	+0	++A	++++			
10^{-3}	353	00	00	00	00	00	00	00
	354	+0	+++	+++G				
10^{-4}	355	00	00	00	00	00	++AG	
	356	00	00	00	00	00	00	00
10^{-5}	357	00	00	00	00	00	00	00
	358	00	00	00	00	00	00	00

Ce tableau montre que le virus du 30ème passage est actif à 10^{-3} (2 cobayes généralisés sur 2) et à [illegible] et 10^{-4} (1 cobaye sur 2 inoculés dans chaque série).

Il a été fait des essais de cultures avec un liquide amniotique purifié et stérilisé par [illegible].

- chauffage à 60° et filtration sur Seitz,
- autoclavage et centrifugation,

Après incubation, la recherche de la virulence des cultures a montré, comme l'indique le tableau n° 40, que les 2 modes de préparation sont satisfaisants.

TABLEAU N° 40

	N° Cob.	1	2	3	4	5	6 joure
Chauff. 60° + Seitz	359	±0	+0	+0	+0	++A	++A
Autoclavage + centrifugat.	360	00	±0	+0	+?	++AB	

Les cobayes ont eu des lésions nettes de généralisation.

Des expériences de culture en masse ont été faites au 27ème passage, par demi-litre :

pulpe de peau	50 cc.
broyat virulent du 26ème passage	50 cc.
liquide amniotique purifié	400 cc.

Le mélange est réparti en fioles plates, dites fioles à toxine, de 1 l. La suspension tissulaire est mélangée et aérée continuellement par un mouvement de balancement imprimé aux fioles par un agitateur mécanique (6 oscillations par minute, allant jusqu'à découvrir la moitié du fond des fioles. Au 2ème jour, le broyat de culture (pH 7,2) communique une fièvre aphteuse généralisée au cobaye (tableau n° 41).

TABLEAU N° 41

N° Cob.	1	2	3	4	5	6 j.
361	+0	++	++A	++A	++A	++A
362	±0	+0	+0	++A	++AB	

Un essai de vaccin de type VALLEE-SCHMIDT-WALDMANN de formule classique a été fait avec du virus de culture (27ème passage en culture de demi-litre). L'injection de 50 cc. de vaccin, par voie sous-cutanée, au niveau du fanon, protège une vache (N° 976) contre une épreuve virulente (10.000 U.V.) faite 17 jours après, alors qu'

[illegible] (F 374) [illegible] fièvre aphteuse généralisée. Cet essai [illegible] est [illegible].

Conclusion :

Les difficultés techniques de la préparation de milieux de culture complexes sont facilement levées par l'utilisation du liquide amniotique de vache déprotéiné et purifié. Ce liquide permet de cultiver facilement, in vitro, le virus aphteux sur peau de foetus de vache. Une culture d'un demi-litre donne, en 2 jours, 50 gr. de pulpe virulente, ce qui est, à peu près, le rendement moyen en aphtes d'une vache.

b) Culture du virus aphteux en liquide céphalo-rachidien :
(Expériences personnelles)

Les cultures en milieu liquide sont composées de 3 éléments :
- la suspension de virus
- le tissu
- le liquide nutritif

Ce sont des cultures [illegible] sur cultures de tissus de type classique, dont tous les éléments sont stériles ; l'addition d'antibiotiques n'est pas nécessaire, nous en ajoutons parfois par raison de prudence.

[illegible]

Les cultures sont faites dans des flacons d'Erlenmeyer [illegible] [illegible] goulot. Les flacons sont fermés [illegible] [illegible] de gaze, et capuchonnés avec un [illegible] [illegible] bouchon de caoutchouc recouvert d'un [illegible] [illegible].

La verrerie [illegible] se compose de pipettes de 1, 5 et 10 [illegible] de boîtes de Pétri de 6 et 15 cm. de diamètre contenant un verre [illegible] [illegible] et de tubes à centrifuger de 25 cc.

Le lavage de la verrerie se fait dans des bouilloires émaillées [illegible]. La succession des temps de lavage est [illegible] de la verrerie 15 m. dans l'eau de conduite savonneuse, rinçage à l'eau courante puis à l'eau distillée [illegible] distillée 15 m., immersion [illegible] 85°, séchage à l'étuve, cotonnage, emballage dans du papier blanc sulfurisé, et stérilisation au four Pasteur à [illegible]

Les instruments fins : couteaux, pinces et ciseaux à iridec-

tomie, sont placés entre deux compresses d[illegible] se métallique. Une pince de Kocher permet de [illegible] la compresse pour prendre les instruments. [illegible] enveloppée de papier blanc sulfurisé, est stérilisé[illegible] four, à 160°, pendant 1 h. Les gants de caoutchouc sont [illegible], enveloppés de papier et stérilisés à l'autoclave à 120° pendant ½ heure.

Les diverses manipulations sont faites dans une [illegible] c'est une caisse vitrée avec 2 manches en nylon pour le passage des bras et des mains.
(v. la disposition du matériel dans la boite p. 392bis)

La boite vitée, chargée de son matériel, est désinfectée, avant chaque travail, par l'irradiation d'une lampe à U.V. pendant 20 m.

Les tissus et les liquides ne sont introduits dans la boite qu'au moment de la mise en culture, ou des repiquages, soit ½ h. environ après la fin de l'irradiation, temps nécessaire à l'évacuation de l'ozone.

Les manipulation des pipettes sont faites facilement, [illegible] (v. schéma [illegible] et 3 soupapes à billes d'agathe, v. schéma p. 392bis). On évite ainsi l'ouverture de la boite et l'usage de la bouche.

[illegible] on des constituants des cultures

[illegible]

[illegible] de virus :

Les mises en culture de 7 séries sont inoculées avec du virus de type O Pontoise (VALLÉE) d'origine bovine, de passage récent sur bovin, sauf pour la 3ème, virus passé sur Cobaye depuis une vingtaine d'années (Collection du Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires). La 1ère série est inoculée de type A d'origine [illegible], [illegible] Limoges, que nous avons récoltée sur des bovins atteints, lors de l'épizootie de juillet 1951. Le virus O de notre [illegible] série est [illegible] Brescia (UBERTINI), de passages sur bovin.

Préparation de la suspension virulente :

Pour la série 1, nous sommes parti de lymphe recueillie stérilement, à l'aide d'une seringue, dans un aphte primaire non rupturé de [illegible] d'une vache inoculée depuis 24 h. La lymphe est diluée au 1/10 en liquide de J.-André THOMAS, pH 7.6. C'est la technique la plus simple.

Les 4 autres mises en cultures sont ensemencées par une suspension de virus obtenue à partir de parois

d'aphtes de bovins ou de cobayes. Les aphtes, de passage récent, sont pesés, broyés au sable dans un mortier, dilués au 1/10 en liquide céphalo-rachidien, ou en liquide de J.-André THOMAS, pH 7,6. La suspension est centrifugée pendant 15 m. à 6.000 tours-minute. Le liquide surnageant est filtré sur disque Seitz [illegible], après lavage préalable du filtre par 20 cc. de liquide salin. Les 10 premiers cc. de suspension sont éliminés. Cette technique nous a servi à préparer le virus d'ensemencement des mises en culture des séries 3, 4 et 5.

La suspension de départ de la série 2 n'a pas été filtrée, mais elle a été centrifugée, 2 fois 15 m., en tubes [illegible] ; la partie surnageante a été décantée entre les 2 temps de centrifugation.

Titrage :

Nos suspensions sont titrées sur Cobaye au moment de chaque mise en culture. Pour effectuer ce titrage, la suspension de 10^{-1} est diluée en liquide de J.-André THOMAS à 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} et 10^{-6} ; sur un porte-tubes, nous plaçons 6 tubes à essais, dans le premier, à gauche, nous versons, à la pipette, la solution 10^{-1}, dans les 5 suivants, vers la droite, nous mettons 9 cc. de liquide de J.-André THOMAS. En ajoutant 1 cc. du 1er tube dans le 2ème nous obtenons 10^{-2}, après agitation, avec la même pipette, nous reprenons 1 cc. dans ce 2ème tube pour le verser dans le 3ème : 10^{-3} et ainsi de suite. Chaque dilution est éprouvée sur 2 cobayes : chacun reçoit ½ cc. dans le derme du coussinet plantaire gauche ; un aide tient le cobaye par le corps et présente la face supérieure du coussinet. L'injection se fait avec une aiguille de [illegible] montée sur une seringue fine "à insuline" graduée en 1/[illegible] cc. Nous pratiquons 3 à 4 trajets dans le sens longitudinal du coussinet. Les cobayes sont colorés pour les différencier. Voici, par exemple dans le tableau n° 42 le résultat du titrage de la suspension du virus aphteux de la mise en culture de la série 1.

TABLEAU N° 42

Dil. du virus	N° Cob.	1	2	3	4	5	6	7	[illegible]
10^{-1}	363	+0	++A	++A	++AB				
	364	+0	+0	++A	++A	++AB			
10^{-2}	365	+0	++	++A	++A	++A	++A	++A	++A
	366	+0	++OB	++AB					
10^{-3}	367	+0	+OA ?	++A	++A	++A	++A	++A	++A
	368	+0	+??	++A	++AB				
10^{-4}	369	+0	+??	++A	++A	++A	++A	++A	++A
	370	+0	++AB						
10^{-5}	371	?0	+0	++A	++A	++A	++A	++A	++A
	372	00	00	00	00	0+A	0+A	P+A	0+A
10^{-6}	373	00	00	00	00	00	00	00	[illegible]
	374	00	00	00	00	00	00	00	00

[illegible] tous les cobayes ont eu, jusqu'à ce[illegible] de généralisation aphteuse.

Nos autres suspensions, éprouvées dans les mêmes conditions, ont des titres de 10^{-4} (série 2), 10^{-5} (série 3), 10^{-3} (série 4), 10^{-2} (série 5).

Tissus de cultures:

[illegible] de foetus de bovins [illegible]. Les foetus doivent être âgés de 4 mois environ, ils ont une longueur de 25 à [illegible] d'un volume approximatif de 50 x 30 x 15 cm.

Prélèvement des utérus.

Nous prélevons les utérus dans les abattoirs municipaux sur des vaches venant d'être abattues. Nous [illegible] et pour sectionner [illegible] et le vagin à la hauteur du col de l'utérus. Nous plaçons les [illegible]. Le transport en automobile au laboratoire peut se faire dans une cuve flambée à couvercle, ou dans le coffre métallique d'une étuve portative à parois d'eau chauffée à 38° ; celle-ci, employée pour nos premières expériences, n'est pas indispensable.

Dès l'arrivée au laboratoire, l'utérus est posé sur un plateau flambé, il est lavé à l'eau tiède savonneuse, [illegible] à l'alcool iodé, puis badigeonné à la teinture d'iode. Il est alors placé à l'étuve à 38° où il se dessèche en surface avant l'opération.

Prélèvement des tis[illegible]

L'utérus est p[illegible] de nouveau, badigeonné à la tein[illegible] iode. La corne utérine gravide est incisée d'un [illegible] coup sur presque toute sa longueur. Les lèvres de la plaie, solidement maintenues par des pinces, sont [illegible]vées au maximum et écartées [illegible] avec de nouveaux instruments. Avec une main, on soulève et on extrait le [illegible], on coupe le cordon [illegible] sur un plateau stérile recouvert d'une feuille de cellophane, & le tout est placé dans la boite d'ARGANE-[illegible]ELILLE. Les prélèvements de peau s'effectuent facilement avec des ciseaux et des pinces. [illegible] grands lambeaux, celle de la tête, plus résistante, est délaissée. Les fragments de peau et d'organes sont mis, séparément, dans des boites de Pétri ; ils peuvent être conservés un certain temps à + 2°.

Liquide céphalo-rachidien

Le liquide céphalo-rachidien (l.c.r.) est un liquide qui peut être considéré comme un ultrafiltrat, un dialysat du plasma sanguin [illegible], ce n'est pas un transsudat puisqu'il ne contient pas de fibrinogène, ni une véritable sécrétion, il s'élabore au niveau des plexus choroïdes [illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
tissus inoculées de virus, puisque les cultures de virus réussissent très bien et pendant de longues séries de passages. Il nous a permis de simplifier la technique de culture du virus aphteux de façon très appréciable, puisque le virus se multiplie dans les cultures de tissus composées seulement de l.c.r. non modifié et de tissus adéquats. Les milieux peuvent être préparés à l'avance et stockés comme des milieux de bactériologie courante.

Prélèvement :

Nous avons essayé de prélever le l.c.r. sur des bovins vivants par ponction lombaire, les difficultés sont grandes sans résultats pratiques. Le point d'élection est l'espace lombo-sacré entre la dernière vertèbre lombaire et la première sacrée, à l'intersection [illegible] termes des iliums. Sur les gros bovins la contention à l'étable est difficile ; l'épaisseur des muscles au-dessus des vertèbres lombaires rend difficile l'introduction d'une aiguille ou d'un trocart de 12 à 15 cm., dans le canal rachidien ; les instruments se tordent facilement, lors des mouvements de défense. Chez les veaux, la ponction [illegible] l.c.r., d'une stérilité relative. Ces résultats, joints à l'inquiétude [illegible] cher une méthode sur l'animal abattu.

Aux abattoirs municipaux de la Villette, ou de Vaugirard, nous avons mis au point une technique de prélèvement stérile d'une grande [illegible] des viandes. Nous choisissons un échaudoir où les animaux sont [illegible] la partie inférieure de l'encolure. Les sacrificateurs ne doivent pas toucher la colonne vertébrale, ce qui facilite notre prélèvement. Il s'agit le plus souvent de taureaux, rarement de vaches.

Nous intervenons à la fin de la saignée quand l'animal, toujours couché et entravé, n'a plus de réflexes, et avant la coupe des cornes et des os de la face. Nous demandons à un boucher de [illegible] ment à la colonne vertébrale et sur une longueur de 15 cm. à quelques cm. derrière le "chignon". Un aide, avec son pied placé au niveau du museau maintient la région de la nuque en extension. En décollant la peau avec un bistouri stérile sur 5 à 10 cm. nous

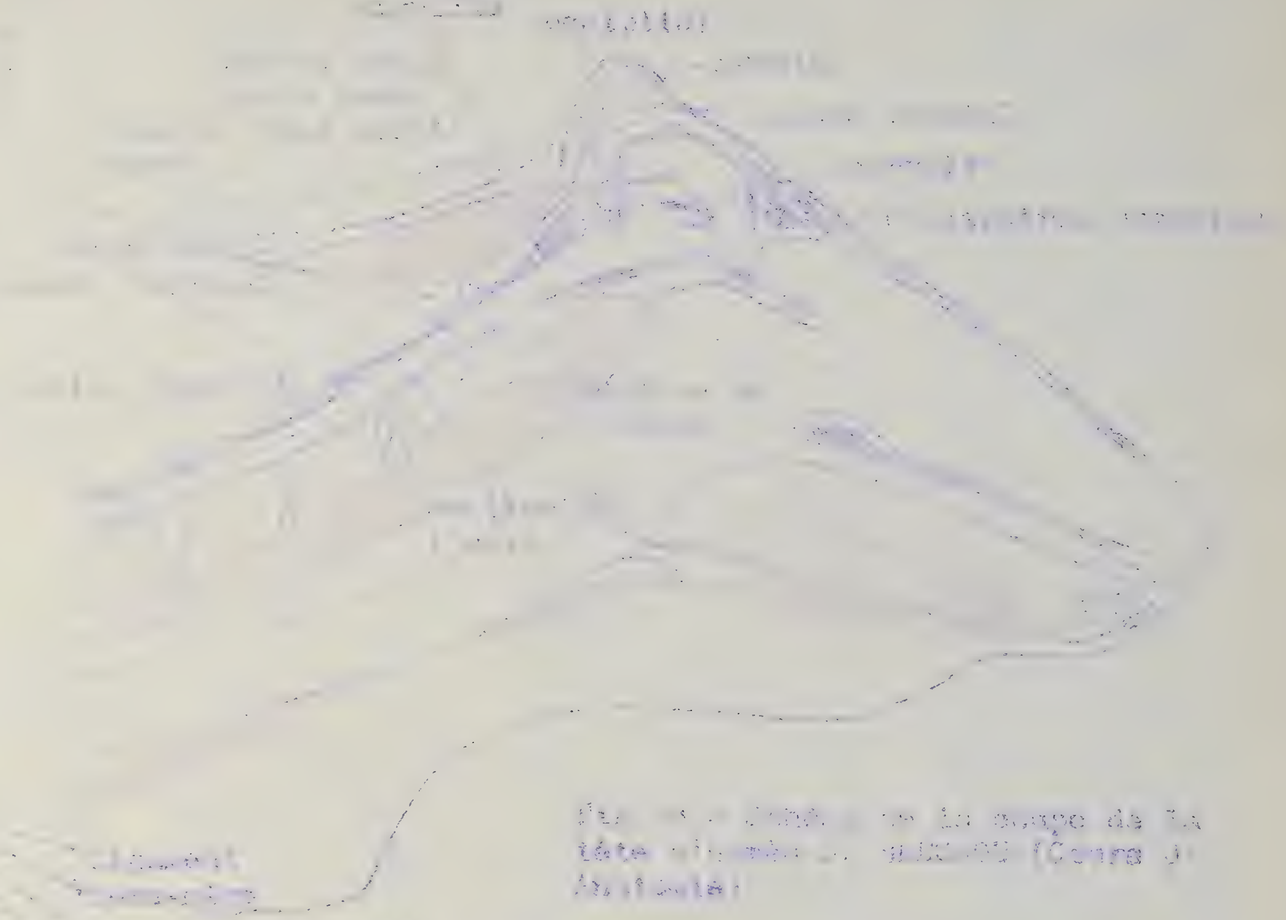
[illegible]

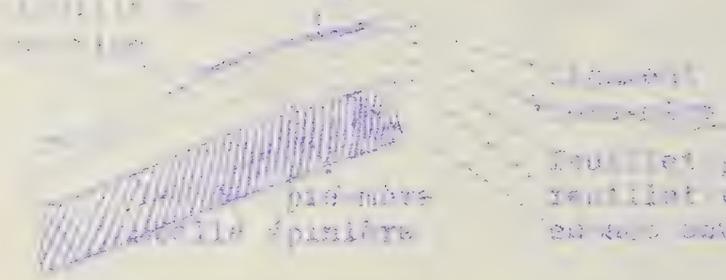
...espace atloïdo-occipital, assez large [illegible]
lequel se trouve le [illegible] postérieur du [illegible]
Avec une aiguille métallique de 8 cm. sur 2 [illegible]
montée sur une seringue en verre de 100 [illegible] (par ex.
une seringue à insufflation pulmonaire) tenue de la
main droite, on perfore facilement le ligament vert[ébral dors]
orsal et la dure-mère, en guidant la pointe de l'[aiguille avec le bout]
de l'index gauche. Le ligament et la dure-mè[re sont]
épais chez les bovins, et on sent nettement une [cessa]-
tion de résistance, vaincue quand l'aiguille pénètre
dans le canal rachidien. Le l.c.r. se trouve entre le
feuillet viscéral de l'arachnoïde et la pie-mère
(fig. p. 390). La pression du l.c.r. peut être suffi-
sante pour pousser le piston de la seringue ; nous
aidons l'écoulement en tirant légèrement sur le piston.
On voit le jet du liquide clair dans la seringue. [On]
recueille ainsi 200 et même 250 cc., on vide la seringue
dans un flacon stérile [illegible]
paraffiné et percé de 2 aiguilles de même type que celle
du prélèvement. Ces aiguilles sont cotonnées, l'une est
débouchée pour ajuster la seringue, l'autre sert à la
sortie de l'air du flacon.

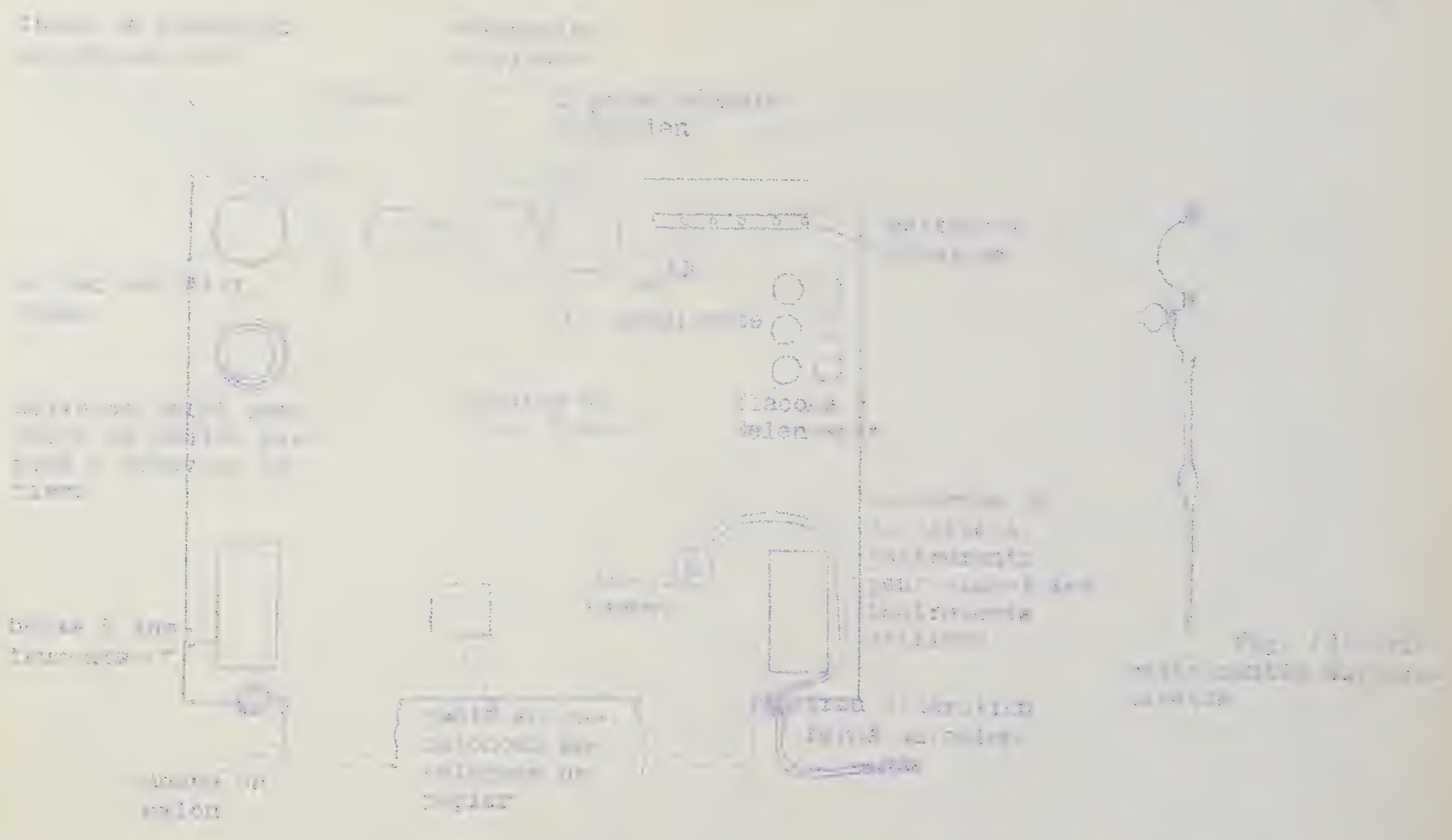
On obtient ainsi un l.c.r. stérile en utilisant des
instruments et de la verrerie stériles. Il n'est pas
besoin d'employer d'antiseptique au niveau de la plaie
ce qui, d'ailleurs, nuirait à la qualité de la [illegible]

Nous avons mis au point une 2ème technique qui per-
met de ne pas couper la peau et de ne faire perdre au[cun]
temps aux bouchers. L'animal est saigné [illegible] le [illegible]
dépouillé. Les os de la face sont [illegible] au [illegible]
selon le mode coutumier. Il est bon d'attirer l'atten-
tion du boucher afin qu'il ne coupe pas trop près du
cerveau (v. fig. p. 390). La langue est enlevée et la
carcasse suspendue. C'est à ce moment que nous inter-
[illegible] deux parties,
sur la fente longitudinale, au [illegible] de la colonne
[vert]ébrale. On aide [illegible] en avant de façon à
[illegible] les muscles ainsi que le
ligament cervical [illegible] jusqu'au
au ligament [illegible] stérile. Le
[illegible] la technique [illegible]

[illegible]




feuillet pariétal
feuillet viscéral
arachnoïde
pie-mère
moelle épinière
espace sous-arachnoïdien (rempli de L.C.R.)



Il existe un inconvénient lors de ces prélèvements sur l'une et l'autre méthode : une fois, sur 3 ou 4, le l.c.r. est souillé de sang, soit par suite de la piqûre d'une veine des plexus méningés, ou de la paroi, soit d'une hémorragie lors de la chute de l'animal qui se fait "à la juive", par entravement des pattes et de la tête et traction par un treuil. Nous avons éliminé tout l.c.r. teinté de sang, ou trouble. Les flacons de l.c.r., bouchés et capuchonnés de papier, sont transportés des abattoirs au laboratoire, sans précaution spéciale. Ils sont conservés à + 2°.

Préparation :

Pour la commodité de nos expériences, et pour avoir à notre disposition du l.c.r. stérile, nous le centrifugeons à 6.000 tours-minute, pendant 10 m., puis nous le filtrons, sans difficulté, sur disque Seitz EKI, et nous le répartissons, stérilement, dans des ampoules-bouteilles de 10 cc. fermées ensuite à la flamme. Ces ampoules sont éprouvées 24 h. à l'étuve à 37°, puis stockées à la glacière à + 2°. Lors de nos premiers essais, nous avons réparti le l.c.r., sans filtration, dans des ampoules que nous avons conservées, un certain temps, à + 2° ; les ensemencements sur gélose et bouillons aérobies et anaérobies restent stériles, dans la plupart des cas.

Composition :

Propriétés physiques :

Dès le prélèvement, le l.c.r. est clair comme de l'eau de roche, de saveur salée ; conservé à la température ambiante, il se trouble peu à peu et, au bout d'une heure, on observe un léger précipité qui, en 3 h., s'organise en un réseau très fin. La manipulation du flacon entraîne la rétraction du réseau en un petit peloton gris clair qui tombe au fond du flacon. Il se dépose parfois quelques petits débris de tissu cérébral. Le l.c.r. peut contenir, normalement, 0 à 2 leucocytes (lymphocytes en général) par mm³, ils se trouvent éliminés par la centrifugation ou la filtration.

Le l.c.r. bovin est légèrement alcalin est légèrement alcalin, son pH que nous avons mesuré à l'électrode de verre est, en moyenne, de 8 à 8,2 (avant et après stérilisation par chauffage ou filtration, pour POLONOVSKI, le pH du l.c.r. humain est de 7,9.

La densité du l.c.r. est de 1.007-1.008, son point de congélation -0°56 à -0°58. L'indice de réfraction est de 1,3347 à 1,3351.

Le l.c.r. chauffé ne coagule pas, il se trouble imperceptiblemen en raison des quantités minimes de protéines.

Composition chimique : Le l.c.r. est riche en éléments minéraux mais très pauvres en matières protéiques

Pour 1.000 cc. (1)

rés. du sec	(sels minéraux (cendres)	8,82 gr.)	10 gr.
	(matières organiques	1,18 gr.)	

(1) D'après MESTREZAT, POLONOVSKI, DULAS, FOURESTIER & de FOSSEY

chlorure de sodium	1,2 - 7,[illegible] gr.
chlorure de potassium	[illegible] gr.
chlore	[illegible] gr.
calcium	[illegible] gr.
glucose	[illegible] - [illegible],8 gr.
acide lactique	[illegible] - [illegible],16 gr.
protéines (albumine	[illegible],15 - 0,22 gr.
) globuline	[illegible],267 gr.
(rapport albumine / globuline = 3	
azote restant	0,12 - 0,17 gr.
urée	0,2 - 0,3 gr;
acide urique (total	0,014 gr.
) libre	0,005 gr.
lipides (cholestérol	0,0011 gr.
) acides gras	[illegible],0428 gr.
(phosphatides	0,0095 gr.

Les protéines sont pratiquement absentes : 280 mgr. par litre au maximum. La concentration en chlorure de sodium est assez élevée, elle rétablit l'équilibre osmotique diminué du fait que les éléments solubles du plasma y sont en quantité plus faible, par ex. le glucose (1 gr. p. 1.000 dans le plasma). Le l.c.r. contient certainement un grand nombre de substances biologiques qui n'ont pas été, jusqu'ici, mises en évidence. Le l.c.r. doit être prélevé sur des animaux en bonne santé, car CRISTOL & MONNIER ont prouvé la possibilité de fermentation lactique dûe à des microbes consommant le glucose du l.c.r. ; il se forme ainsi de l'acide lactique dans le l.c.r. qui [illegible] la réserve alcaline et qui, par sa présence, pourrait nuire au virus aphteux dans nos cultures.

Liquide salin :

Nous utilisons le liquide de [illegible] dont la formule est donnée dans le chapitre précédent.

La solution [illegible] de la glycine [illegible] de 7,2. Nous ajoutons, parfois [illegible] p. 1.000 [illegible], ce qui permet de déceler une infection microbienne, par l'acidité produite.

Pour éviter une infection accidentelle de nos cultures, nous ajoutons parfois de la pénicilline. Il est pratique d'utiliser [illegible] comprimés, conditionnés stérilement, de pénicilline [illegible] cristallisée sodique, dosés à 20.000 U.O. ; 1 comprimé dissous dans 10 cc. de liquide nous permet d'avoir à [illegible] disposition une solution contenant 2.[illegible] U.O. [illegible]

En principe, l'addition de liquide [illegible] n'est pas nécessaire à nos cultures qui [illegible] avec le [illegible] seul, et avec lequel il est possible de diluer la suspension virulente. Cependant lorsque nous ajoutons de la pénicilline, il est préférable de la dissoudre dans du liquide de J.-André THOMAS ; en effet, nous avons remarqué que la dissolution des comprimés de pénicilline dans le liquide céphalo-rachidien produisait un trouble blanc ; celui-ci n'est pas soluble à 37°, et n'est pas dû à des colonies [illegible] car les ensemencements sur gélose et bouillons restent stériles.

L'addition de petites quantités de liquide de J.-André THOMAS dans nos cultures augmente le tampon de nos préparations.

Conditions générales des cultures :

Mise en culture :

Une culture-type contient, par flacon d'Erlenmeyer de 50 cc.
- 1 cc. de suspension virulente
- 1 gr. de tissu,
- 7 cc. de liquide céphalo-rachidien
- 1 cc. de liquide de J.-André THOMAS, contenant 2.000 U.O de pénicilline G (pH 7,6)

soit 10 cc. par culture. Le pH est voisin de 7,6.

Toutes les manipulations sont faites dans la boite d'ARMAND-DELILLE, les mains gantées. Les tissus choisis (en général lambeaux de peau d'environ [illegible]) sont placés dans un grand verre de montre et lavés 1 à 2 fois en L.C.R., jusqu'à ce que celui-ci ne soit plus teinté de sang. Nous coupons les fragments aux ciseaux courbes à iridectomie, en petits morceaux, d'au maximum 1 cm³. Afin d'avoir 1 gr. de peau sans avoir [illegible] de peser, ce qui pourrait nuire à la stérilité, nous avons taré un tube à centrifuger de [illegible] et inscrit un repère à 1 gr. Après le découpage du tissu, nous introduisons les morceaux jusqu'au repère et nous ajoutons, dans le tube à centrifuger, 10 cc. de [illegible] pour un dernier lavage. Après une centrifugation de 5 m. à [illegible], nous aspirons, à la pipette, le liquide surnageant [illegible].

Nous ajoutons alors 1 cc. de la suspension de virus au 1/1[illegible] et, après agitation, nous laissons le tissu et le virus en contact pendant 10 m. à + 4°.

Le mélange est ensuite [illegible] à l'aide d'une pipette à grosse embouchure, dans le flacon d'Erlenmeyer dans lequel nous introduisons, à la pipette, [illegible] puis 1 cc. de liquide de J.-André THOMAS contenant [illegible] de pénicilline G. Le flacon bien tamponné, [illegible] est légèrement alcalin [illegible] colorimétrique au rouge [illegible] de verre, comme contrôle.

Le flacon est bouché [illegible] capuchonné de papier [illegible].

Les cultures sont mises à incuber, à 37°, pendant [illegible] h., à l'obscurité.

A la sortie de l'étuve, le contenu des flacons sert au repiquage de nouvelles cultures et au titrage sur Cobaye. Pour cela, la culture est versée dans un tube à centrifuger stérile et centrifugée 5 m. à 2.000 tours. Le liquide surnageant est décanté, le culot est mis dans un mortier et broyé au sable. Le liquide surnageant sert à diluer le broyage. La dilution se trouve ùn peu inférieure au 1/10, en raison des pertes dûes aux manipulations ; nous complétons à 10 cc. avec du l.c.r.

De cette suspension, nous prélevons quelques cc., en vue d'un titrage sur Cobaye, en principe nous inoculons ½ cc. de cette suspension dans le coussinet plantaire gauche de 2 cobayes. Les dilutions supérieures à 10^{-2}, 10^{-3}... sont faites en liquide de J.-André THOMAS, chaque dilution est titrée sur 2 cobayes.

Pour des besoins divers, nous conservons, à + 2°, 2 ou 3 cc. de broyage ; parfois pour les longues durées de conservation, nous gardons une partie dela culture (tissus et liquide) avant broyage, à +2°, ou mieux à -20°.

Repiquage :

Le broyage de la culture incubée qui se trouve dilué au 1/10, sert de matériel virulent pour la culture suivante, c'est-à-dire le 1er passage et ainsi de suite. Ces passages sont conduits dans les mêmes conditions que la mise en culture, mais la suspension du virus est remplacée par 1 cc. de broyage de la culture précédente au 1/10.

Résultats :

Evolution des cultures :

Stérilité bactériologique :

Nos cultures sont bactériologiquement stériles, sauf quelques unes faites pour des essais divers et souillées accidentellement, par exemple certaines du 6ème passage de la série 1, pour lesquelles nous avions utilisé une peau foetale conservée depuis trop longtemps (16 jours) dans de mauvaises conditions (arrêt de la glacière). La technique et la quantité de pénicilline sont suffisantes pour corriger nos fautes involontaires.

Les divers contrôles, fréquemment répétés au cours des passages, par frottis colorés par la méthode de GRAM, ou par ensemencements sur bouillons ou gélose, sont toujours restés stériles, lorsque nos conditions expérimentales étaient respectées. Toutefois, il est intéressant

de signaler que nous avons eu la surprise, dans un des essais de culture faits avec un extrait embryonnaire de poulet, d'observer un grand nombre de trypanosomes dans la culture. Ceux-ci provenaient d'oeufs infectés par des poules atteintes de trypanosomiase. En effet, à l'autopsie de quelques poules de notre élevage, mortes après une rupture de l'oviducte, nous avons décelé la présence de trypanosomes dans les caecums et l'oviducte ; nous n'avons pu déterminer, jusqu'ici, la responsabilité des trypanosomes dans la rupture de l'oviducte. Il est toutefois certain que les parasites ont infecté les oeufs et qu'ils ont trouvé, étant donné leur nombre, dans nos milieux de culture, un terrain favorable.

Culture des tissus :

Les cellules de la peau foetale subissent, dans nos cultures, une multiplication appréciable. On peut voir, macroscopiquement, dans certaines cultures, un léger halo autour des fragments et, en retournant les flacons, quelques fragments restent collés à la paroi. La culture cellulaire est confirmée par l'examen microscopique qui montre, autour du greffon, une couronne de cellules de divers types, en particulier fibroblastiques. On peut observer des mitoses.

pH :

Le pH du liquide de nos cultures est, avant l'incubation, voisin de 7,6 - 7,9 (mesure à l'électrode de verre). L'alcalinité du l.c.r. (8 - 8,2) est compensée par le pH de la peau foetale (6,5) et celui de la pénicilline (6,9). Après 48 h. d'incubation, le pH baisse légèrement sans dépasser la neutralité, par exemple le broyage de la 15ème culture (série 1) dans son propre liquide de culture est de 7,12, celui de la 6ème culture (série 2) est de 7,15, et son liquide seul est de 7,2.

Culture du virus aphteux :

Séries de passages :

Nous avons réalisé 6 séries de passages arrêtées volontairement, sauf la série 3, dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau n° 45 (v. p. 396).

Série 1 : Nous avons réalisé 30 passages par repiquages de 48 h. en 48 h. du virus des cultures, dilué au 1/10. Le titre du virus de la mise en culture est de 10^{-5}. L'inoculation de cette dilution à 10^{-5} détermine une généralisation, respectivement en 72 et 120 h à 2 cobayes ; les inoculations des dilutions plus faibles : 10^{-1} à 10^{-4} sont suivies de l'apparition d'un aphte primaire en 24 h. et d'une généralisation en 48 ou 72 h. Le titrage du virus de la mise en culture est donné dans le tableau n° 42. Le détail des passages est résumé dans le tableau n° 43 (p. 396). Au 30ème passage le virus de culture a un titre de 10^{-4}. Etant donné qu'à ce passage la dilution du virus d'origine atteint 10^{-31} on peut être certain de la multiplication du virus aphteux dans nos conditions expérimentales. Le titrage sur Cobaye du virus au 30ème passage donne les résultats énoncés dans le tableau n° 44 (p. 398).

TABLEAU N° 43

Série N°	Virus de mise en cult. Type	Origine	titre au cob.	Tissus	Cultures Nbre de pass.	Titre du dern. pass.
1	0	Pontoise (Vallée) lymphe	$10^{-[illegible]}$	peau foe-tus bov.	30	10^{-4}
2	0	Pontoise (Vallée) broyage d'aphtes centrifugé	$10^{-[illegible]}$	peau foe-tus bov.	10	10^{-2}
3	0	Cob. (Vallée) broy. aphte filtré	10^{-5}	peau foe-tus bov.	2	0
4	A	Bov. (Limoges, var. 4 broy. aphte filtré	10^{-3}	peau foe-tus bov.	5	5.10^{-1}
5	0	Bov. (-resc.) broy. aphte filtré	$10^{-[illegible]}$	peau foe-tus bov.	5	10^{-2}
6	0	Pontoise Vallée 22ème pass. série 1	10^{-5}	sarcome de Rous	4	10^{-2}

TABLEAU N° 44

Dil. vir.	N° Cob.	1	2	3	4	5	6	7 j.
10^{-1}	375	+0	+0	++AB				
	376	+0	+0B	++AB				
10^{-2}	377	00	+0	++A	++A	++A	++A	++A
	378	00	+0	+0	+0	++	++A	++A
10^{-3}	379	00	+0	++	++AB			
	380	00	+0	++A	++AB			
10^{-4}	381	00	+0	+0A	++AB			
	382	00	00	00	00	00B	++AB	
10^{-5}	383	+0	+0	+0	+0	+0	00	00
	384	00	00	00	00	00	00	00

A part les cobayes inoculés par la dilution 10^{-5}, tous les cobayes, en particulier ceux ayant reçu la dilution 10^{-4}, ont eu des lésions de généralisation aphteuse.

TABLEAU N° 15

Passages de la série 1

…sa- …es …te …51	Dil. virus d'origine	Virulence (essai sur 2 cobayes) N° Cob.	Lésions primaires	Lésions de générulisat.	Titre	Observations
…e en …ture …4/51	10^{-1}	256 257	+ (24h.)) + (24h.))	++A (48 h.) /++A (72 h.)	10^{-5}	liq. c. r. non filtré
…er …/5	10^{-2}	268 269	+ (24h.)) + (24h.))	++A (48h.) ++AB (48h.)	10^{-6}	
…ème …/5	10^{-3}	270 271	+ (30h.)) + (30h.))	++OB (72h.) ++A (72h.)		
…ème …/5	10^{-4}	272 273	+ (48h.)) + (72h.))	++ (72 h.) +OOB (72h.)		
…ème …/5	10^{-5}	274 275	+ (48h.)) + (120h.))	++ (72 h.) 0 (11 jours)	10^{-1}	
…ème …/5	10^{-6}	276 277	+ (72h.) + (24h.)	OOA (120h.) O+A (72h.) puis ++A (144 h.)	10^{-1}	
…ème …/5	10^{-7}	278 279	+ (48h.) + (72h.)	+OA (72h.) ++ (96h.)		
…ème …	10^{-8}	280 281	+ (24h.) + (16h.)	++ (72h.) ++ (24h.)		peau fraîche
…ème …/5	10^{-9}	282 283	+ (10h.) + (10h.)	++ (48h.) ++ (16h.)		
…ème …/5	10^{-10}	284 285	+ (20h.) + (20h.)	++A (72h.) +OOB (72h.)	10^{-5}	
…ème …/5	10^{-11}	286 287	0 (7 j.) + (48h.)	O+A (144h.) 0 (7 j.)		
…ème …/5	10^{-12}	288 289	+ (20h.) 0 (7 j.)	+OOB (48 h.) 0 (7 j.)		liq. c. r. frais
…ème …/5	10^{-13}	290 291	+ (24h.) + (20h.)	+OA (96h.) ++?A?B (72h.)		
…ème …/5	10^{-14}	292 293	+ (6h.) + (48h.)	++A (48h.) ++A (96h.)	10-[illegible]	

(suite du tableau n° 45)

14ème 30/5	10^{-15}	294 295	+ ((6h.) ? ((24h.) puis 0	++A?B (96h.) 0 (8 j.)		
15ème 1/6	10^{-16}	296 297	+ (48h.)) + (72 h.))	0 (8 j.) ++A (120h.)		liq. c. r. filtré
16ème 3/6	10^{-17}	298 299	+ (48h.)) + (72h.))	0 (8 j.) ++A (120h.)		
17ème 5/6	10^{-18}	300 301	+ (48h.)) + (24h.))	+OA (96h.) ++A (96h.)	10-3	
18ème 8/6	10^{-19}	302 303	± (144h.)) + (48h.))	±OA? (192h.) +OOB (120h.)		
19ème 10/6	10^{-20}	304 305	+ (48h.)) + (48h.))	+OOB (96h.) +OA (72 h.)		
20ème 12/6	10^{-21}	306 307	+ (24h.)) + (48h.))	++ (72h.) +OA (96h.)		nouvelle peau l.c. 1/2h. 110°
21ème 14/6	10^{-22}	308 309	+ (24h.)) + (24h.))	+OA (48h.) ++AB (72h.)		
22ème 16/6	10^{-23}	310 311	+ (24h.)) + (24h.))	++A (96h.) ++AB (48h.)	10-5	
23ème 18/6	10^{-24}	312 313	+ (24h.)) + (24h.))	0 (6 j.) ++AB (72h.)		
24ème 20/6	10^{-25}	314 315	0 (8 j.) ± (24h.)	0 (8 j.) 0 (8 j.)		liq. c. r. altéré
24ème 25/6 refait	10^{-25}	316 317	− (24h.) +OA?B? (48h.)	0 (8 j.) ++AB (72h.)		liq. c. r. frais
25ème 27/6	10^{-26}	318 319	+ (24h.) + (72h.)	+OA (48h.) +OA (96h.)		
26ème 29/6	10^{-27}	320 321	0 (8 j.) + (24h.)	0 (8 j.) +OA (96h.)	10-4	
27ème 1/7	10^{-28}	322 323	+ (24h.) + (72h.)	+OA (48h.) +OA (96h.)		
28ème	10^{-29}	non passé sur Cobaye				
29ème 5/7	10^{-30}	324 325	+ (48h.) + (24h.)	++ (72h.) +OA (96h.)	10-3	liq. c. r. frais
29ème 5/7	10^{-30}	326 327	± (24 h.) + (24h.)	0 (7 j.) ++A (72h.)		flacon pré- paré depuis le 22/5
30ème 7/7	10^{-31}	328 329	+ (24h.) + (24h.)	+OA (48h.) +OOB (48h.)	10-4	

Le virus du 25ème passage sur l.c.r. a été passé sur liquide amniotique déprotéiné et il a été fait 3 passages sur ce même liquide (p. 395).

Série 2 : Cette série de 10 passages est réalisée dans les mêmes conditions que la série 1, toute fois le virus de départ est de l'épithélium d'aphtes au lieu de lymphe, son titre est de [illegible] ; au 10ème passage, il est de 10^{-3} (le virus d'origine a été dilué 10^{-1}).

Série 3 : La peau de foetus bovin de la culture est inoculée avec un virus adapté au Cobaye de titre 10^{-5} ; le virus ne s'est pas multiplié, la mise en culture et le 1er passage sont virulents, mais le 2ème passage l'est à peine et le 3ème ne l'est plus. Ce résultat prouve la survie du virus qui se conserve jusqu'au 2ème passage, il est normal, étant donné que ce virus adapté au Cobaye, n'est plus virulent pour le Bovin, par injection intradermique dans la langue ; in vitro, il n'a pas non plus récupéré son activité pour le tissu et le l.c.r. bovins.

Séries 4 et 5 : Elles sont faites dans le but de vérifier la possibilité de culture des virus de types A et C, elles sont arrêtées au 5ème passage, les titres sur Cobaye sont de 10^{-3} (virus A) et 10^{-2} (virus C) à la mise en culture, ils sont de 5.10^{-1} (virus A) et 10^{-2} (virus C) au 5ème passage.

Série 6 : C'est une série spéciale destinée à connaître si le virus aphteux (22ème passage, série 1) cultive, in vitro, sur un tissu tumoral d'origine aviaire : le sarcome de Rous. Le titre du virus a varié de 10^{-5} à 10^{-2} au cours de 6 passages positifs.

Le nombre de passages est suffisant pour montrer, que si les conditions expérimentales sont respectées, le virus peut se multiplier.

Variations de l'activité pathogène du virus en culture :

[illegible]

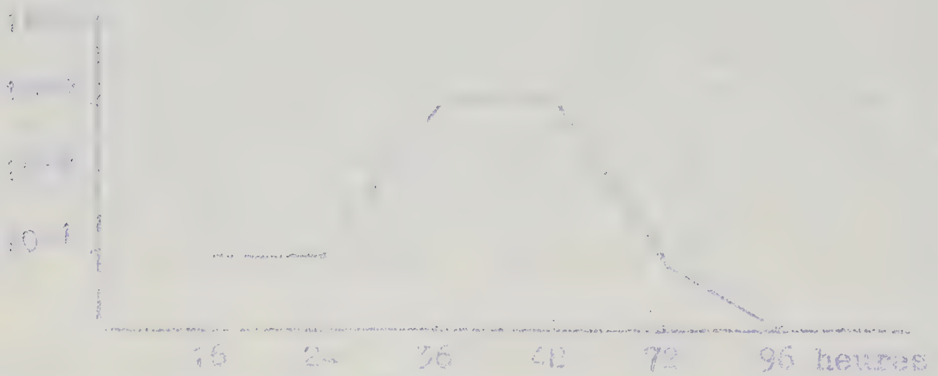
Titre :

Variations du titre au cours d'une culture en fonction de la durée d'incubation :

Nous avons recherché le titre du [illegible] passage de la série [illegible] à des moments différents de l'incubation : [illegible] 95 h. Pour chaque [illegible] de milieu de culture [illegible]

[illegible]

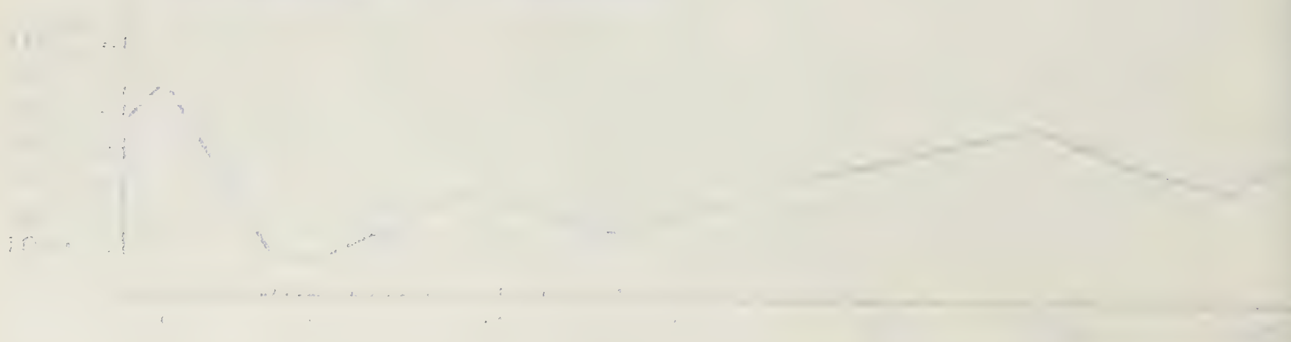
en abscisse : le temps en heures



[illegible] en cours d'une série de cultures [illegible] il dimi[illegible] pour rester à [illegible] puis de [illegible]

[illegible] au cours des passages nécessaires à l'adaptation de [illegible] à retrouver son titre initial. La qualité du tissu [illegible] nous [illegible] décelable pour une culture faite avec un L.C.R. ont [illegible] un titre au [illegible] égal [illegible]

[illegible]



Les titres peuvent paraître bas, mais il s'agit de titrages sur cobaye et notre virus de départ est un virus d'origine bovine; ce virus est actif à 10^{-7}, 10^{-8} sur bovin, mais seulement à [illegible] très rarement à [illegible] sur cobaye. En raison de ces circonstances, le titre des virus de nos cultures est donc très acceptable.

Virulence :

La virulence subit de nombreuses variations parallèles aux variations du titre, au cours des premiers passages, mais, par la suite les variations sont indépendantes. Prenons, par exemple, l'évolution de la virulence, au cours de la série 1 :

Le virus de la mise en culture détermine des lésions classiques en des temps normaux (tableau n° 42), à 10^{-1} : aphtes primaires en 24 h., aphtes de généralisation aux [illegible] et à la bouche en 96 h. ou 120 h. Dès les 3ème et 4ème passages, la virulence diminue, de même que le titre, en effet, les aphtes primaires n'apparaissent qu'en 48 ou 72 h. (3ème passage) et 48 ou 120 h. (4ème passage), la dimension des aphtes est, d'ailleurs, plus petite. L'apparition des lésions de généralisation suit un ordre désordonné : [illegible] (3ème passage), [illegible] (5ème passage), ou même les lésions secondaires sont incomplètes [illegible] (4ème passage), ou absentes : [illegible] (Cob. 275, 4ème passage). Au cours de ces passages, le virus lutte pour s'adapter à son nouveau mode de culture. Il est si peu virulent au 5ème passage qu'il provoque des aphtes primaires très petits qui guérissent vite (en 48 h.) et n'entraînent pas d'immunité locale puisque de nouveaux aphtes (secondaires ?) apparaissent [illegible] jours après la guérison des premiers. Cette évolution paradoxale est le signe d'une variation de la virulence dans le sens d'une atténuation, puisque le temps nécessaire à la généralisation augmente de plusieurs jours.

Au 7ème passage, le virus s'est adapté puisque la virulence [illegible] l'accroît, par rapport à son pouvoir [illegible] d'origine [illegible] les aphtes primaires apparaissent [illegible] [illegible] (7ème et [illegible] passages).

[illegible] par la diminution [illegible] [illegible]

[illegible] jamais [illegible]

[illegible]

-inent le [illegible] [illegible] [illegible]
Les activités [illegible] [illegible] [illegible] les va-
riations de notre virus de culture ; [illegible] indépen-
dantes du titre (13ème passage : 6 h. [illegible]
titre bas, 10^{-2}).

Lors des 9ème, 10ème, 11ème passages, la [illegible] diminue, alors que le titre se maintient [illegible]; [illegible] atténuation a une cause connue : l'altération [illegible] conservé trop longtemps dans de mauvaises [illegible] ; [illegible] [illegible] [illegible] cor-
rects, la virulence [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] des éléments de la culture, vis-à-vis de la virulence, au cours de passages ultérieurs : 18ème et [illegible]ème passages [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] à l'autoclave) ; le rétablissement des bonnes conditions de culture est suivi de l'augmentation de la virulence.

A part des variations dûes aux conditions de la cul-
ture, la [illegible] [illegible] [illegible] jus-
qu'au [illegible] passage, [illegible] la généralisation [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] d'appa-
rition [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] in vitro.

Autres caractères biologiques du virus de culture :

Nous n'avons décelé aucune modification des princi-
paux caractères du virus de nos cultures, en dehors des variations du titre et de la virulence que nous venons d'indiquer.

Le pouvoir de multiplication est conservé in vivo et in vitro.

Les affinités [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] puisque [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] les mêmes, en parti[illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] ovine, on peut penser que le virus de [illegible], d'origine ovine, a conservé son activité [illegible] [illegible]

[illegible] [illegible] sur avec le [illegible] [illegible] jours après [illegible] des lésions [illegible] été [illegible] [illegible]ation [illegible] suivie [illegible] [illegible] rares [illegible] [illegible]

TABLEAU N° [illegible]

N° cob.	Guéris après inoculation du virus O de :	1	2	3	4	5	6
256	1er passage	+0	+0	+0	+0	+[illegible]	
384	[illegible]ème "	+[illegible]	+0	+0	+0	+0	
[illegible]	1[illegible]ème "	00	00	+0	+0	+[illegible]	
[illegible]	30ème "	+0	+0	+0	+0	+0	
329	30ème "	00	00	00	00	00	
385	virus témoin d'épreuve	+0	++A	++A	++AB		
386	"	+0	+0	+0A	++A	++A	

Le virus témoin provoque une fièvre aphteuse classique sur 2 cobayes, alors qu'il ne donne que les lésions primaires [illegible] sur le cob. [illegible] Les cobayes ayant reçu antérieurement [illegible] virus de culture. L'inoculation d'épreuve est faite le même jour pour tous les cobayes, soit 15 jours après le 30ème passage et [illegible] après le 1er passage. Le temps d'immunité est donc d'une durée [illegible]male.

Maintien de la spécificité des types :

Les [illegible] types de virus [illegible] O, A, C cultivent aussi bien les uns que les autres avec notre méthode ; les série 1, 2, 3 (virus O) 4 (virus A) et 5 (virus C) en apportent la preuve. Les virus ne subissent pas de mutations de types. Les épreuves d'immunité [illegible] sur Cobayes guéris nous ont donné la preuve qu'au 30ème passage le virus O de la série 1 était toujours le même type, et qu'il n'immunisait pas contre les types A et C.

Voici, résumées dans le tableau n° 47, les épreuves d'essai [illegible] passage du virus O de culture (30ème pas. [illegible] série [illegible]) [illegible] cobayes guéris depuis 15 jours d'une fièvre aphteuse à virus des types O, A ou C.

TABLEAU N° 47

Guérison après F.A. de type :	N° Cob.	1	2	3	4	5
O	387	+0	+0	+0	+0	+0
	388	00	+0	+0	+0	+0
	[illegible]	+0	+0	+0	+0	+0
	390	[illegible]	[illegible]	+0A	++A	++AB
A	391	+0	++	++	++AB	
	392	00	+0	+00B	++0B	++AB
	393	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
C	394	00	++	++AB		
	395	00	00	+0AB	++AB	

A l'examen de ce tableau on [illegible]
guérie de virus C n'ont que des [illegible]
que les trois cobayes guéris de v[illegible]
[illegible]

Des épreuves identiques faites avec [illegible] 5èmes passages des types A et C ont prouv[illegible] d'eux, avait conservé son type.

Conservation du virus de culture :

[illegible] vons repiqué, avec succès, des passages conservés [illegible] pendant 10 [illegible]. Pour les durées plus longues, nous [illegible] la culture entière à -20°, elle conserve son activit[illegible] pendant 3 mois, mais ensuite la virulence s'a[illegible] nous avons fait un passage au bout de 6 mois et nou[illegible] vons eu que des lésions primaires. [illegible] conserve mal à + 2°, et même à -20°.

Notre virus de culture se conserve certainement moins bien que le virus en épithélium recueilli *in vivo*, la ly[illegible]philisation augmenterait probablement son temps de conser[illegible]vation.

Résumé :

Les 3 types de virus aphteux cultivent sur peau [illegible] tale bovine en l.c.r., ils conservent leurs qualités [illegible] géniques spécifiques. Le virus de culture a un titre [illegible]ximum de la 36ème à la 48ème heure de culture ; au cours de passages en série le titre diminue puis, peu à peu, [illegible] tendance à reprendre son titre initial. Au point de [illegible] de sa virulence, après une période d'adaptation, le t[illegible] d'incubation diminue et le temps d'apparition des lés[illegible] de généralisation augmente. Les variations de titre e[illegible] de la virulence sont indépendantes. Le titre, et surtout la virulence, sont nettement influencés par la bonne qualité des tissus et du l.c.r. Les autres caractères du [illegible]rus, dont le pouvoir immunisant, n'ont pas subi de modi[illegible]cations décelables par nos moyens expérimentaux. Le te[illegible] de conservation du virus de culture est assez court. N[illegible] ne pensons pas que le virus ait acquis, par la culture, dans ce milieu *in vitro* qui lui paraît favorable, des qualités nouvelles [illegible] plus grande de ses propriétés, le virus de culture ne paraît pas de [illegible] que le virus [illegible]

[illegible]

[illegible]

variations [illegible] simplicité [illegible] qui permet de [illegible], en [illegible] les divers facteurs en [illegible], tissu, [illegible] et conditions [illegible]. Le principe de nos cultures et les quantités des éléments (sauf indication contraire) restent les mêmes.

Variations du tissu :

Nous avons testé vis-à-vis de la culture du virus [illegible] : des peaux de foetus bovins de différents âges, conservées selon différents modes, des peaux de différentes espèces animales, [illegible] et porcine, des tissus [illegible] embryonnaires ou adultes, des cellules de tissus, et un tissu cancéreux, de sarcome de Rous de la poule. Les cultures sont faites en l.c.r. selon notre technique [illegible], elles sont inoculées avec les virus de culture, en même temps que les passages de la série 1 sur peau de foetus : ces passages servent de témoins.

Cultures sur peaux de foetus de différents âges :

Les cultures, conduites avec des peaux fraîchement prélevées de foetus de 15, 25, 30, 45, [illegible] donnent des résultats [illegible]laires ; toutefois, à partir de 55 cm, les peaux sont [illegible], difficiles à couper [illegible] et à broyer [illegible] broyage peut entraîner des erreurs de titrage par défaut. Les peaux des petits foetus sont gélatineuses, peu épaisses, de faible rendement. Il est certain que ce sont les peaux de foetus de 25 à 45 cm qui [illegible]nent le mieux. Nous avons réuni, dans le tableau n° 48, les résultats des épreuves de virulence du virus au 7ème passage cultivé sur différentes peaux (dilution au 1/10)

TABLEAU N° 48

Long. foetus	N° Cob.	1	2	3	4	5
15 cm.	396	+0	++A	++A	++A	++A
	397	+0	+0	+0A	++A	++A
25 cm.	398	?0	+0	++A	++A	++A
	399	+0	++A	++AB		
30 cm.	280	+0	++	++A	++A	++A
cult. témoin	281	+0	++	++A	++A	++A
[illegible]	[illegible]	+0	++A	++A	++A	++A
	401	+0	++	++A	++A	++A
55 cm.	402	?0	+0	+0	++A	++A
	403	+0	+0A	++A	++A	++A
60 cm.	404	+0	+0	+0	+0	+0
	405	+0	++	++A	++A	[illegible]
70 cm.	406	?0	+0	+0A	+0A	+0A
	407	00	00	+0	++	++A

La généralisation [illegible] est à peu près équivalente chez tous les cobayes, sauf le n° 404 qui devait présenter une résistance individuelle, puisque le cobaye ayant reçu la même suspension a eu une fièvre aphteuse classique.

Cultures sur peaux conservées :

Le mode de conservation de la peau joue un rôle primordial. Nous avons eu des cultures encore acceptables avec des peaux (30 cm.) conservées en grands lambeaux 16 jours à + 2°. Le broyage, au hache-viande, en morceaux de 1 à 2 mm², peut être conservé 5 jours, à + 2°, sans inconvénient. Nous verrons que la conservation de peaux en flacons de culture tout préparés est possible pendant plus d'un [illegible]

La congélation à -20°, [illegible] jours seulement, nous donne de mauvais résultats ; elle fait éclater les cellules (le [illegible] et les rend inaptes à la culture du virus aphteux.

Les autres traitements violents de la peau : chauffage 15 m. à 100°, immersion 1 h. dans l'alcool éthylique à 96°, broyage de la peau au mortier, sont aussi nuisibles.

Dans le tableau n° 49, nous groupons les résultats de l'épreuve de virulence de ces différentes cultures (tableau n° 49, p. 409).

Ce tableau prouve que toute modification de la vitalité des cellules de la peau est nuisible à la culture du virus, en effet, aucun virus de culture n'entraîne de lésions de généralisation si le tissu est congelé, chauffé à 100°, immergé dans l'alcool ou broyé. Le cobaye n° 421 est le seul à présenter des aphtes à la bouche, sans lésions primaires, nous ne pouvons pas en tenir compte.

Les cellules de la peau doivent être intactes pour que le virus puisse se développer. La conservation à + 2° en lambeaux (16 jours) ou même en petits fragments prêts à cultiver (5 jours) est possible. L'altération des peaux conservées à + 2° [illegible] la virulence du virus de culture, nous l'avons observé [illegible] et 10ème passages. L'altération des peaux [illegible] conservation trop longue dans [illegible] fonctionnement (arrêt [illegible]

Cultures sur peaux de différentes espèces animales

Les peaux de foetus de brebis (20 cm.) et de truies (25 cm.) permettent nos cultures en l.e.r., aussi bien que la peau de foetus de vache. Le résultat de nos essais faits avec le virus du [illegible] passage est relaté dans le tableau

[illegible]

Peau foetus de [illegible]	[illegible]	1	2	3	4	8 j.
Témoin	408 409	[illegible]	++ ++	++A ++A	++A ++A	++A ++A
à + 2° 4 jours	[illegible] 411	[illegible]	++A +0	++A +0A	++A ++A	++A ++A
à + 2° 8 jours	[illegible]	[illegible]	+0 ++	+0A ++A	++A ++A	++A ++A
à + 2° 16 jours	[illegible]	[illegible] +0	+0 +?	+0 +?	+0 +?A	+0 ++A
à + 2° 5 jours coupée en morceaux de 1 à 2 mm²	[illegible] 417	+0 +0	++A +0	++A +0	++A +0A	++A +0A
à -20° 4 jours peau de 55 cm.	[illegible]	?0 ?0	00 00	00 00	00 00	00 00
à - 20° 4 jours peau de 30 cm.	[illegible]	?0 ?0	00 00	00 00	00 000B	00 000B
15 m. à 100°	[illegible]	[illegible]	00 00	00 00	00 00	00 00
1 h. de alcool 96°	[illegible]	[illegible]	00 00	00 00	00 00	00 00
Broyage	[illegible]	[illegible]	00 00	00 00	00 00	00 00

[illegible]

Culture	N° [illegible]	1	2	3	4	5 j.
Témoin 21ème pass.	308 309	+0 +0	#0A +0	++A ++AB	++A	++A
Peau de foetus de brebis	428 429	+0 +0	+0 ++A	+0A ++AB	++A	++A
Peau de foetus de truie	430 431	?0 +0	+0 +0	+0 ++A	+0 ++A	+0A ++A

[illegible]

[illegible] différents tissus embryonnaires bovins

Nous avons testé les tissus de foetus bovins [illegible] euses de la langue, des gencives, du mufle, [illegible] foie, rate, thymus, testicule, coeur, muscles, [illegible] ques, cotylédon : dans l'espèce bovine, il est [illegible], au doigt, les 2 parties du cotylédon, [illegible] cotylédon maternel est jaune et épais, le cotylédon foetal [illegible] rouge et mince.

Les inoculations sont faites avec du virus du 11ème passage (série 1). Après 48 h. à 37°, les cultures sont ensemencées en bouillons et sur gélose, pour vérifier leur stérilité bactériologique, et inoculées au 1/10 à des cobayes pour éprouver leur virulence. Les ensemencements à 37°, pendant 3 jours, restent stériles ; le trouble des cultures avec thymus et testicule que nous avons observé était dû aux tissus et non à une pollution.

Le résultat des inoculations est donné dans le tableau n° 51 (p. 411).

Ces résultats de culture en l. c. r. confirment les travaux antérieurs. Les tissus riches en épithélium : muqueuse, poumon, thymus, peau, sont favorables : tous les cobayes inoculés avec les cultures à base de ces tissus ont des lésions de généralisation, cependant les cultures sur rein ont donné des lésions incomplètes. Les cultures sur testicule, coeur et cerveau ont fourni un virus atténué (généralisation aphteuse incomplète et lésions peu importantes sur les 4 cobayes), celles sur rate sont encore plus atténuées (les lésions primaires sont longues à apparaître (4 et 5 jours) ; les cultures sur foie et muscles sont avirulentes (même pas de lésions primaires).

Il est curieux de constater que les cotylédons maternel et foetal n'ont pas la même action sur la culture du virus aphteux : si le cotylédon maternel permet d'obtenir un virus relativement actif, puisqu'un cobaye sur 2 a des lésions de généralisation, le cotylédon foetal donne un virus très atténué, un seul cobaye sur 2 présente, très tardivement, des lésions primaires.

Le mélange de différents tissus réceptifs dans une même culture : peau, poumon, thymus, donne un aussi bon virus que les cultures à un seul tissu (tableau n° 51).

Tableau N° [illegible]

Tissu	N° Cob.	1	2	3	4	5	6
Témoin 12ème passage	290	+0	+0	+0?0	+0A	++A	++A
	291	+0	+0	++?A?B	++AB		
Muqueuse buccale	432	+0	++	++AB			
	433	+0	+0	+0?	+0A	+0A	+0A
Poumon	434	?	+0	+0	++A	++A	++A
	435	+0	+0	+0A	++A	++A	++A
Rein	436	+0	+0	+0	+0A	+0A	+0A
	437	?0	?0	++	++	++	++
Foie	438	00	00	00	00	00	00
	439	00	00	00	00	00	00
Rate	440	00	00	?0	+0	+0	+0A
	441	00	00	?0	?0	+0	+0
Cerveau	442	00	?0	+0	+00B	+00B	+00B
	443	?0	+0	+0	+0A	+0A	+0A
Thymus	444	+0	+0	++A	++A	++A	++A
	445	?0	+0	+0	+0A	++A	++A
Testicule	446	00	00	?0	+0	+0	+0
	447	?0	+0	++	++	++	++
Coeur	448	+0	+0	+0A	+0A	+0A	+0A
	449	?0	?0	?00B	mort		
Muscle	450	00	00	00	00	00	00
	451	00	00	00	00	00	00
Cordon ombilical	452	+0	+0	00	00	+0	+0A
	453	+0	+0	+0	++A	++AB	
Cotylédon maternel	454	?0	?0	+0	+0	+0	++
	455	+0	+0	+0A	+0A	++A	++A
Cotylédon foetal	456	00	00	00	++	+0	++
	457	00	00	00	00	00	00
Mélange de tissus	458	+0	+0	++A	++A	++A	++A
	459	00	00	+0	+0A	++A	++A

TABLEAU N° [illegible]

Tissu	N° Cob.	1	2	3	4	5	6
Témoins 20ème passage	366	+0	+0	++	++AB		
	367	±0	+0	+0	+0A	+0A	+0A
Moelle rouge	460	+0	+0	++A	++A	++A	++A
	461	+0	+0	+0	+0	mort	
Moelle jaune	462	00	00	00	00	00	00
	463	00	00	00	00	00	00

Cultures sur tissus adultes :

Les tissus adultes, poumon et rein de Bovin ont in-hibé nos cultures, nous n'avons pas poursuivi leur étude car ils n'offraient pas d'intérêt particulier pour nos essais expérimentaux. Les travaux de BOYNTON nous ont incité à faire des essais de culture de virus sur moelle osseuse de bovin. Dans le métacarpe d'un bovin adulte, nous avons prélevé, stérilement, de la moelle osseuse grasse jaune au niveau de la diaphyse, et de la moelle rouge osseuse dans les épiphyses. Les cultures du virus du 20ème passage avec la moelle rouge sont virulentes, mais non celles avec la moelle jaune (trop adipeuse), comme nous le voyons dans le tableau n° 52 (p. 411) qui relate les inoculations aux cobayes.

Cultures sur tissu cancéreux :

Nous avons recherché si le virus aphteux pouvait se multiplier en L.e.r. <u>in vitro</u> sur le Sarcome de Rous. Ce [illegible] allantoïde d'oeuf de poule en incubation, il est dû à un [illegible] de voir si le virus aphteux pouvait cultiver sur un tissu cancéreux d'origine aviaire, car les tissus de la poule ne permettent pas la culture in vitro. Les fragments de peau de nos cultures habituelles sont remplacés par des fragments de sar-[illegible] la mise en culture est notre virus du 22ème passage (série 1) titré à [illegible] nos cultures et le titre du 4ème est 10^{-2}. La virulence est certainement atténuée, mais la culture est possible. Le résultat de l'épreuve de virulence sur cobaye, de la mise en culture et du 4ème passage, est donné dans le tableau n° 53.

TABLEAU N° 53

Sarcome de Rous	N° Cob.	1	2	3	4	5	6 j.
mise en cult.	464	+	+OOB	+OOB	++AB		
	465	00	+0	++A	++A	++A	++A
4ème passage	466	00	+0	+0	+0A	+0A	+0A
	467	00	00	+0	++	++	++

A la 1ère culture le virus est actif, puisque les 2 cobayes ont des lésions généralisées ; au 4ème passage la virulence se maintient, mais s'atténue puisque la généralisation aphteuse est incomplète.

Variations du liquide céphalo-rachidien.

Dans notre série I, les 15 premiers passages sont faits avec le liquide c.r. tel que nous l'avons récolté puis, pour stocker le l.c.r. en ampoules stérilisées, nous le filtrons sur disque Seitz EK1 (pH 7,7 après filtration) et nous l'utilisons pour les passages du 15ème au 19ème, ensuite, toujours pour simplifier la préparation, nous distribuons le l.c.r. dans des ampoules de 10 cc. et nous les stérilisons à 110° pendant 30 m. (pH 7,8), le l.c.r. ainsi préparé est celui de nos 20ème au 30ème passages. A plus forte raison, la tyndallisation 3 jours de suite à 56° n'a pas d'action sur la valeur du l.c.r., mais l'autoclavage est plus simple. Les cultures sont virulentes, quelle que soit la préparation du l.c.r. Une stérilisation à l'autoclave a fait brunir une de nos séries d'ampoules, nous n'avons pas réussi à en déterminer la cause et notre culture dans ce l.c.r. brun (24ème pas. tableau n° 45) n'est pas virulente.

La congélation du l.c.r. à -20° n'altère pas ses qualités. Le remplacement du l.c.r. par du liquide salin de J.-André THOMAS (pH 7,6), ou du tampon phosphaté (pH 7,6) atténue, dans une certaine mesure, la virulence des cultures. Le l.c.r. contient donc certaines substances favorables, indispensables aux cultures en longues séries. Dans le tableau n° 54, le résultat des inoculations de ces différentes cultures est exposé :

TABLEAU N° 54

	N° Cob.	1	2	3	4	5	6 j.
Témoin 9ème pass.	[illegible]	[illegible]	+0	++	++A	++A	++A
l.c.r.	[illegible]	00	+0	+0	+0A	+0A	+0A
l.c.r. filtré Seitz	[illegible]	+0	+0	+0	+0	++A	++A
EK1	[illegible]	+0	++	++A	++A	++A	++A
l.c.r. stérilisé	[illegible]	[illegible]	+0	+0A	+0A	++A	++B
	[illegible]	[illegible]	+0	+00B	++AB		
l.c.r. congelé	[illegible]	+0	+0	+0	++A	++A	++A
	[illegible]	00	00	++	++A	++A	++A
liquide de J.-André	[illegible]	00	+0	+0	++	++A	++A
THOMAS	[illegible]	[illegible]	00	+0	+0	+0	+0
liquide phosphaté	[illegible]	00	+0	+0	+0	++A	++A
	[illegible]	00	00	00	+0	+0	+0

La généralisation est équivalente pour tous les l.c.r., elle s'établit plus lentement et pour un nombre limité de cobayes, avec les liquides salins, ce qui laisse à penser que le nombre de passages en leur présence doit être limité.

[illegible] organi[illegible] non modifiés :

Le remplacement [illegible] par des liquides organiques de composition voisine [illegible]. Les milieux de l'oeil : humeurs aqueuse et vitrée [illegible] à peu près la même composition que le liq[illegible] céphalo-rachidien ; POLONOVSKI donne les chiffres suivants pour les matières protéiques : en gr. pour 100 cc.

protides totaux	0,025
albumine	0,0078
globuline	0,0123
amino-acides	0,029

Dans un oeil de bovin, on peut recueillir 1/2 à 1 cc. d'humeur aqueuse, par ponction de la chambre antérieure de l'oeil et aspiration à la seringue, et 3 cc. environ d'humeur vitrée par ponction de la chambre postérieure. L'humeur vitrée forme un gel qu'il est nécessaire de fragmenter et de centrifuger, [illegible] nos essais, nous nous servons du liquide surnageant.

[illegible] est toujours virulent [illegible]. Il existe chez les porcs, sains d'apparence, une certaine quantité de liquide péricardique, sa présence est constante, sa quantité variable. Aux abattoirs, à l'ouverture du péricarde d'au moins 25 porcs, [illegible] vingtaine de cc. de liquide. Il est [illegible] moment où le porc [illegible], et aussitôt après l'éviscération ; le boucher fend le sternum [illegible]'au péricarde, sans le [illegible]. Avec une aiguille [illegible] et une seringue, nous récoltons [illegible] liquide péricardique. Le [illegible] perforation fréquente du péricarde [illegible] saignée. Le liquide péri[illegible] jaune. Il coagule, [illegible]rogène, le caillot est [illegible] ; le liquide péri[illegible] dont la composition paraît voi[illegible] mais nous n'avons pas trouvé [illegible]. La quantité de protéines de [illegible] quantité faible par rapport [illegible] p. 100 cc. (POLONOV[illegible]

[illegible] prélevé en quantité [illegible] essayé entier non modifié [illegible] plusieurs foetus d'âges [illegible]

Les essais de cultures comparatifs [illegible] virus aphteux, dans ces 4 liquides, sur peau de foetus bovin de 30 cm. donnent des résultats aussi bons que le [illegible], sauf pour le [illegible] virus plus atténué.

Les résultats [illegible] sont [illegible]

Tableau n° [illegible]

Virus (Type passage [illegible])	[illegible]		[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Liq. [illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Liq. [illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	00	[illegible]

Les [illegible] sont équivalentes, sauf pour le liquide [illegible] sur [illegible] générale tardive [illegible] Le liquide [illegible] doit être [illegible], comme [illegible] organique que [illegible] on trouve en plus [illegible] aux milieux [illegible] culture de virus aphteux, mais [illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible] cette température [illegible] jusqu'au [illegible]

[illegible] + 2° est à peu près [illegible]

TABLEAU N° 56

Températ[illegible]	N° C[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	4	5 j
[illegible]	270	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	
[illegible] passage	271	+0	+0	[illegible]	[illegible]	
[illegible]	486	+0	+0	+0	[illegible]	
	487	[illegible]	+0	+0	[illegible]	
[illegible]	488	?-	+0	[illegible]	[illegible]	
5°	489	00	00	[illegible]	[illegible]	+0
[illegible]	490	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	491	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
+2°	492	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1er passage	493	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	494	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible] passage	495	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

[illegible] généralisation sont [illegible] à [illegible] avec les cultures placées à [illegible] qu' avec celles mises à 37°. Le premier passage placé à + 2° conserve son activité, mais il n'y a pas de multiplication, car un 2ème passage à +2° ne donne qu'un [illegible] primaire à un cobaye [illegible]

[illegible]

[illegible] un flacon [illegible] avant de le boucher [illegible], la culture [illegible] puisque les 2 cobayes [illegible] ont eu une [illegible] aphteuse au moins aussi rapide que ceux [illegible] témoin (21ème passage) [illegible] procédé [illegible], en maintenant le pH plus [illegible] culture, certaines souches [illegible] [illegible] puis que nos passages [illegible] uaient bien sans aération, ni atmosphère spéciale, que les cultures soient bouchées au coton et capuchonnées de papier, ou au bouchon de caoutchouc.

Rapport des qua[illegible] : tissus, l.c.r., virus.

Le l.c.r. permet une concentration élevée de tissu [illegible] nos cultures [illegible] de tissus pour 9 cc. de liquide [illegible] les auteurs classiques. [illegible] tissus pour 15 cc. de liquide.

[illegible] le virus cultivé [illegible] dans le tissu, nous avons fait [illegible] [illegible] 57 [illegible] le résultat des inoculations aux cobayes des cultures du virus [illegible]

[illegible]

Rapport tissu/liquide	N° Cob.	1	2			
1/?	490	+0	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	497	+0	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
1/1?	324	+0	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible] la chloromycétine, à la dose [illegible] [illegible] présence des différents antibiotiques.

[illegible]

Culture avec	N° [illegible]						
chloromycétine	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
auréomycine	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible] pénicilline	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

après une [illegible] le liquide surnageant est dilué à 10 p. [illegible] L'addition d'1 cc. de [illegible] aux cultures n'améliore pas leur virulence, comme on pouvait s'y attendre par les travaux antérieurs. Le [illegible] contient, à lui seul, les éléments nécessaires à la multiplication du virus sur les cellules de la peau foetale.

[illegible] de cultures :

Cultures en milieu solide :

Nous avons suivi la formule des cultures de F[illegible] [illegible] (1947) [illegible] la solution de Tyrode par du l.c.r. Dans une boite de Pétri, nous mettons :

1.5 gr. de peau de foetus bovin (30 cm.)
9 cc. de l.c.r.
5 cc. de plasma de veau (sang recueilli en tubes paraffinés)

Après 48 h. d'incubation à 37°, la culture est broyée en présence de 15 cc. de l.c.r. et centrifugée. L'inoculation d'1/2 cc. de liquide surnageant à 2 cobayes est suivie de l'apparition des lésions de généralisation aphteuse. Cet essai a été entrepris pour montrer la possibilité [illegible] avec le l.c.r., mais celles-ci, par l'addition de [illegible], compliquent notre méthode et introduisent [illegible] non ultrafiltrables du sang que l'on [illegible], à écarter.

Cultures en l.c.r. sans cellules, ou séparé des cellules par une membrane de cellophane.

Nous groupons ces 2 essais de cultures, car ils correspondent à la recherche d'une substance tissulaire, [illegible], qui [illegible] de la multiplication du virus aphteux. Les cultures sans cellules ne réussissent pas, même si le l.c.r. est enrichi [illegible] ou de substances dialysables.

[illegible] dans les cultures in vitro, le liquide baignant le tissu est virulent, mais d'une [illegible] tissu. Nous avons [illegible]

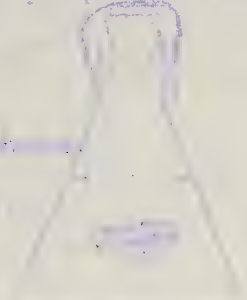
[illegible] sont faites en l.c.r., soit sur peau de [illegible] cm., soit sur le mélange de tissus d'un [illegible] peau, poumon, rate, coeur, moelle osseuse [illegible] cultures sur le mélange sont moins virulentes [illegible] peau, cela tient, [illegible], au pH du mélange qui est toujours plus [illegible] pH de la peau après incubation de 48 h. Les cultures sont faites suivant la technique classique avec le virus de la mise en culture de [illegible].

Après l'incubation, une partie de la culture est broyée entièrement (tissu et liquide) et correspond au virus témoin, une autre partie est centrifugée, le liquide surnageant est éprouvé sur cobayes le culot est broyé et dilué au 1/10 en une solution saline tamponnée à pH 7,6.

On peut voir dans le tableau n° 59, la différence de virulence de chaque partie de culture. Le tissu de la culture sur peau est particulièrement virulent [illegible] généralisation complète et rapide, grande richesse [illegible] lymphe), davantage même que la suspension virulente [illegible] et que la culture sur mélange de tissus. Le liquide de la culture [illegible] la peau est virulent [illegible] ; le liquide de la culture sur mélange de tissus [illegible]. Toutefois les liquides ont un [illegible] protéines étrangères, ce qui est précieux pour les purifications.

Ces résultats incitent à penser qu'il n'y a pas culture dans le liquide lui-même, les essais de culture sans cellules, en l.c.r. seul, liquide de J.-André THOMAS seul, ou l.c.r. à parties égales avec extrait de peau (liquide obtenu par le broyage de peau de foetus au 1/5 en l.c.r. et centrifugé) sont d'ailleurs négatifs ; les traces d'aphtes primaires observées sur le cobaye n° 510, inoculé de la culture en l.c.r. seul, tiennent certainement à la survie du virus aphteux et non à une multiplication du virus (tableau n° 59.

Une 3ème série d'essais destinée à voir si une substance dialysable diffuse des tissus et permet la culture est aussi négative ; ces essais sont effectués en séparant le tissu du liquide de culture par une membrane de cellophane. Des flacons d'Erlenmeyer de 50 cc. sont préparés aves un sac de cellophane maintenu par un bouchon de coton entouré de gaze. Le tissu (1 gr. de peau [illegible]) est introduit dans le sac de [illegible] liquide (7 cc. de l.c.r. + 1 cc. [illegible] + 1 cc. de liquide de [illegible] U.O. de pénicilline) [illegible]



[illegible] le mélange de tissus [illegible], la quantité de [illegible] ivement et, en 48 h., [illegible] au même niveau. [illegible] clair et [illegible] Nous [illegible] 421). La virulence [illegible] survie du virus, car [illegible]

Ces expériences prouvent que les substances tissulaires dialysant [illegible]

virus aphteux en [illegible] particulièrement après la présence de cellules, est nécessaire (1). Dans le tableau n° 59, nous avons groupé ces différents essais. Il ressort nettement l'intérêt de la présence des tissus puisque, en leur présence seulement, la généralisation aphteuse est classique.

Stockage des flacons de cultures tout préparés

Nous préparons des flacons standard de cultures contenant : 1 gr. de tissus coupés aux ciseaux
[illegible]

Les flacons d'Erlenmeyer, ou les flacons type pénicilline conviennent bien. Ils sont bouchés au caoutchouc, capuchonnés de papier et placés à 37° pendant 24 h. pour éprouver leur stérilité. Ils sont conservés à + 2° à l'obscurité. Le temps de conservation peut atteindre au moins 44 jours. Les cultures de virus aphteux faites 7, 14, 21, 30 et 44 jours après la préparation des flacons sont virulentes. Voici, dans le tableau n° 60 (p. 421) le résultat des inoculations faites au Cobaye avec les cultures de virus du 19ème passage, dans un flacon préparé 44 jours à l'avance, et la culture du virus de même passage, en flacon préparé le jour même.

Nous pensons que ces flacons standard préparés à l'avance peuvent être stockés à + 2° pendant 15 jours et plus, comme les milieux ordinaires de bactériologie et qu'ils peuvent rendre ainsi quelques services, en particulier, permettre la préparation, à l'avance, d'un grand nombre de flacons pour une expérience sur une grande échelle.

Les ensemencements peuvent être faits directement à l'étable infectée. Il suffit de prélever une très petite quantité de lymphe dans un aphte non rompu à l'aide d'une seringue contenant déjà 1 cc. de solution de pénicilline (1.000 U.O.). Cet antibiotique n'est pas indispensable, il pare aux infections possibles dans les conditions rurales ; l'emploi de ces flacons permet une bonne conservation du virus pendant son transport au laboratoire, le virus a toute chance de cultiver puisque le milieu est entièrement d'origine bovine.

---

(1) MUCKENFUSS & RIVERS (1930) ont observé que le virus vaccinal en suspension dans un mélange de liquide de Tyrode et de sérum, séparé par une membrane en collodion d'une suspension de cellules rénales, reste plus longtemps actif à 37° que s'il est conservé seulement dans le mélange de Tyrode et de sérum. Ils pensent qu'une substance inconnue diffuse des cellules [illegible]. Nous n'avons pas mis en évidence une [illegible] dans nos cultures avec membrane [illegible] des [illegible]

TABLEAU N° [illegible]

Culture sur	Filtrage de [illegible]	N°	1	2	3	4	5	6 j.
peau	susp. virul. de la mise en cult.	502	+0	+0	+0	++	++	+0
		503	±0	+0	++	++A	++AB	
	liquide	504	00	00	00	+0	++	++A
		505	00	00	00	00	+0	+0
	tissu	506	+0	++A?	++A	++A	mort	
		[illegible]	+0	++A?B?	++AB			
	mélange tot.	508	+0	++A	++A	++AB		
	1/10 (tém.)	509	+0	+0	++A	++A	++A	++A
Mélange de tissus	liquide	[illegible]	[illegible]	00	00	00	00	00
		[illegible]	[illegible]	00	00	+0	+0	++
	tissu	[illegible]	+0	+0	++	++	++	++AB
		[illegible]	[illegible]	+0	+0	++	++A	++A
sans cellules	l.c.r.	[illegible]	[illegible]	00	?0	±0	+0	00
		515	[illegible]	00	00	00	00	00
	liquide de J.-A. THOMAS	[illegible]	[illegible]	00	00	00	00	00
		[illegible]	00	00	00	00	00	00
	l.c.r. + extrait peau	[illegible]	00	00	00	00	00	00
		[illegible]	00	00	00	00	00	00
Tissu et liquide séparé par cellophane	liq. ext. au sac	[illegible]	[illegible]	[illegible]	00	00	00	00
		[illegible]	[illegible]	[illegible]	00	00	00	00
	liq. et tis. int. au sac	[illegible]	[illegible]	00	00	00	00	00
		[illegible]	00	00	00	00	00	00
	liq. extér. au sac	[illegible]	[illegible]	00	00	00	00	00
		[illegible]	00	00	00	00	00	00
	liq. et tis. int. au sac	[illegible]	00	00	00	00	00	00
		[illegible]	[illegible]	00	00	00	00	00

TABLEAU N° 60

	N° [illegible]	1	2	3	4	5	6 j.
Flacon préparé depuis 44 jours	326	±0	?0	?0	00	00	00
	327	+0	+0	++A	++AB		
Flacon témoin préparé le jour de la cult.	324	±0	+0	++	++A	++A	++A
	325	+0	+0	+0	+0A	+0A	+0A

Conclusions :

Le liquide céphalo-rachidien permet de cultiver [illegible] par une mé-thode simplifiée à l'extrême, puisqu'elle peut ne comporter que ces deux éléments et que le milieu se trouve tout préparé ; [illegible] qui suit les règles des cultures [illegible] in vitro, en particulier d'asepsie rigoureuse.

Le prélèvement du liquide céphalo-rachidien sur les bovins est facile [illegible] et on peut en re-cueillir une quantité appréciable, en moyenne 200 cc. par animal [illegible] indiqué.

Le l.c.r. peut être stérilisé par la chaleur : 30 m. à 110°, sans perdre ses qualités.

Nous avons réalisé 5 séries de plusieurs passages du virus aphteux, dont une série de 30 passages et une autre de 16. Deux souches différentes de type O et une souche de chacun des types A et C, d'origine bovine, cultivent [illegible] au cobaye ne se multiplie pas.

Le titre et la virulence sont atténués au début des passages, mais, après adaptation à la culture in vitro, [illegible] et, même la virulence augmente ; elle évolue indépendamment du titre.

Le virus de culture conserve ses propriétés spé-cifiques pathogènes et immunisantes.

Des expériences [illegible] de variations sur le tissu ou sur le l.c.r. nous montrent que les passages réus-sissent avec :

- des peaux de foetus bovins de différents âges et con-servées à + 2° pendant 2 semaines
- des peaux de foetus de mouton et de porc,
- différents tissus embryonnaires, adultes ou cancé-reux [illegible]
- [illegible], filtré sur Seitz, ou autoclavé,
- des liquides organiques : [illegible] aqueuse ou humeur vitrée de bovin,
- liquide [illegible]

La meilleure température d'incubation est [illegible]

Les modifications de l'atmosphère au-dessus de [illegible] sont [illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible] virulence du liquide de culture

des essais de culture en l.c.r. seul et les cultures dont les parties liquide et tissulaire sont séparées par une membrane de cellophane, ne nous ont pas permis de mettre en évidence une substance diffusante des cellules qui favoriserait la culture du virus aphteux. Ces expériences, en présence de membranes de cellophane, ne sont pas définitives car leur nombre n'est pas suffisant, et diverses membranes devraient être essayées.

Nous pensons que ces cultures de virus d'origine bovine, en milieu exclusivement bovin, pourront rendre quelques services, d'autant plus que les flacons de cultures peuvent être préparés à l'avance et stockés un certain temps (15 jours au moins).

Cette méthode, par sa simplicité, permet de faire un grand nombre d'essais, de renouveler les cultures de virus à volonté, ce qui n'est pas toujours facile dans le cas des virus filtrants. Ces cultures peuvent être utilisées à la conservation des souches pures de virus, au diagnostic, au titrage des virus ; elles peuvent être dirigées dans le but de connaître l'influence de substances sur le virus aphteux. La réponse est rapide, il est intéressant de constater qu'avec nos cultures sur le l.c.r., il n'y a passage de virus que si les conditions de multiplication sont satisfaisantes, le virus disparaît, dès le premier passage, en cas contraire ; les conditions de survie et de multiplication semblent différentes d'après l'observation de nos cultures sur le l.c.r.

Bien entendu, il s'agit d'une culture de virus _in vitro_ avec tous ses aléas : mutations du virus, possibilités d'atténuation du titre ou de la virulence, tout comme les cultures _in vitro_, de FRENKEL, en milieu sur liquide [illegible] déprotéiné.

Notre méthode ne peut rester que sur le plan expérimental, étant donné la faible quantité de l.c.r. bovin que l'on peut obtenir. Nous espérons, néanmoins, qu'elle pourra rendre service dans les laboratoires de recherches pour l'étude biologique du virus aphteux et servir à la culture d'autres virus difficiles à cultiver, en prenant le l.c.r. et le tissu réceptif de l'espèce naturellement sensible au virus à cultiver.

(9) [illegible] GÉNÉRALE

Le virus aphteux a entraîné, pour sa culture, de multiples [illegible], [illegible] aussi nombreux [illegible].

Les [illegible] de direction [illegible] ont été [illegible] seulement [illegible], mais aussi la connaissance de nouvelles propriétés biologiques du virus aphteux. [illegible] également [illegible].

[illegible] leur nombre, [illegible] un procédé d'en[illegible] [illegible], [illegible] de recueillir [illegible] [illegible] la filtration est nécessaire, mais elle [illegible] à [illegible] de fortes proportions. Le virus, de plus, [illegible] en quantité [illegible] entre autres [illegible].

Les [illegible] de rendement [illegible] jusqu'ici, la culture [illegible] d'un virus [illegible] n'est pas [illegible] [illegible] une solution définitive.

Les [illegible] caractérisées par [illegible] il est vrai, en [illegible] avec les [illegible] bonne qualité [illegible] [illegible].

Le principe [illegible] [illegible].

La culture [illegible] [illegible] favorable, les [illegible] [illegible], sans ses caractéristiques.

La culture [illegible] [illegible].

d'un potentiel fixe et constant d'oxydo-réduction couplé à un équilibre acido-alcalin convenable, peuvent être réalisées *in vitro* par les méthodes de CARREL, MAITLAND.... Les chercheurs se sont attachés à réaliser la multiplication du virus aphteux *in vitro* par la méthode de culture des tissus, mais "peut-être trop "exclusivement considérée en ce moment" (LECLAINCHE). FRENKEL et ses collaborateurs ont fait un progrès certain par la culture sur peaux de foetus de mammifères artiodactyles, puis sur épithélium de langue de bovins explanté. Dans les méthodes *in vitro* le titre des virus est, en général, plus faible que celui du virus d'aphtes, ce qui limite, dans une certaine mesure, l'emploi du virus cultivé *in vitro*.

Le passage du virus aphteux doit être fait sur tissus d'origine bovine, sinon ses qualités virulente et antigénique s'atténuent plus ou moins rapidement pour cette espèce à laquelle il est généralement destiné sous forme de vaccins ; ceux-ci, préparés à partir de virus [illegible] sur espèces naturellement réfractaires, mais expérimentalement sensibles (Cobaye, Lapin...), ne sont pas satisfaisants par suite des adaptations subies par le virus.

La matière première des nouvelles méthodes : peau de foetus, épithélium de langue bovine, est très économique et facile à se procurer ; elle évite les difficultés soulevées par l'utilisation des carcasses des bovins infectés dont l'importation est refusée par certains pays (Angleterre), ce qui lèse grandement les pays producteurs de viande (Amérique du Sud). L'emploi des foetus, tissus embryonnaires, sous-produits d'un faible prix de revient, source pratiquement illimitée, offre donc un intérêt certain.

[illegible] nécessité de cultiver [illegible] cellules en survie et, plus [illegible] embryonnaires, ont déterminé [illegible] à utiliser le foetus [illegible] expérimentale, pour l'obtention de [illegible] en survie est un organisme vivant [illegible] biologique ; la culture [illegible] est donc intermédiaire [illegible] celle *in vitro*. Le milieu de culture, à base de sang, a un prix de revient [illegible]. Les difficultés possibles ont trait

à la rigueur expérimentale et à l'emploi d'un appareil spécial. Mais, d'une part, l'appareil coeur-poumon artificiel de J.-André T[illegible] est [illegible] que son maniement est d'une grande simplicité [illegible], et, d'autre part, son usage [illegible] la perfusion des foetus entiers puisqu'il [illegible], de la façon la plus simple il permet [illegible] sur lesquels peuvent être cultivés les virus, éventuellement tête avec langue, train antérieur.... ; il permet également les cultures cellulaires massives par irrigation-perfusion, selon la méthode de J.-A. THOMAS (Vème Congrès International du Cancer, Paris 1950), ce procédé, en plasma, est une méthode de culture proprement dire et non de survie : les cellules se multiplient abondamment.

La méthode de culture du virus aphteux sur foetus en survie a toutes ses indications précises, elle se poursuit, et sans l'abandonner, [illegible] l'École de J.-André THOMAS est passée à l'étude d'autres méthodes, sur liquide amniotique déprotéiné et liquide [illegible]. Le prix de revient des éléments de culture [illegible] sont d'un rendement appréciable.

L'emploi d'explant aseptique de peau foetale dispense de l'emploi des antibiotiques, l'asepsie stricte peut être obtenue sans leur secours. Il est possible de préparer de grandes quantités de peaux par l'usage de hachoirs à trous fins. La peau non broyée peut être [illegible] liquide amniotique déprotéiné et [illegible] J.-André THOMAS et J.-Paul THIERY, est peu coûteux, facile à préparer ; c'est un milieu naturel, biologique dont l'étude séparée de chacun des facteurs n'est pas nécessaire, comme pour les milieux complexes, type BAKER par exemple, où une vingtaine de facteurs peuvent varier.

Avec cette méthode, la spécificité est totale, l'explant provient de bovin ainsi que le milieu, rien n'est artificiel. L'aération des cultures [illegible] suffit. Le rendement d'une culture peut être industriel, il est largement équivalent à celui d'une [illegible].

Comparativement, à l'examen de nos recherches personnelles, on constate que le procédé ne varie pas, la source d'explant est la même que dans la méthode précédente, mais le milieu est un dialysat naturel : le liquide céphalo-rachidien. Cette fois l'artifice expérimental est [illegible] totalement puisqu'on utilise, d'une part la peau et les tissus de foetus bovin, d'autre part un liquide tout préparé par l'a[illegible]

L'intérêt de la culture en liquide céphalo-rachidien est semblable à celui de la culture en liquide amniotique purifié, toutefois la source du liquide céphalo-rachidien est si limitée que cette méthode ne peut être utilisée que sur le plan expérimental, mais il n'en reste pas moins que le virus aphteux se multiplie très bien et que l'on atteint la simplicité expérimentale la plus grande.

Pour nous résumer, si l'on s'en tient à la comparaison des méthodes actuelles _in vivo_ et _in vitro_ décrites dans ce travail, on voit qu'il y a un gain pratique et économique certain en faveur des méthodes _in vitro_. Il semble donc que celles-ci soient la voie de l'avenir. Entre les méthodes _in vitro_ : sur explant d'épithélium de langue en milieu synthétique complexe et sur peaux foetales en liquide amniotique déprotéiné, ou en liquide céphalo-rachidien, à supposer que les rendements des cultures et que les titres des virus de cultures soient identiques, on est obligé de constater que le prix de revient le plus bas et la facilité technique sont en faveur des méthodes en liquide amniotique purifié et, éventuellement, en liquide céphalo-rachidien.

Si l'on considère que les foetus peuvent être réceptifs au virus, même si la mère a été atteinte de fièvre aphteuse, ou vaccinée, la peau des foetus constitue un matériel extrêmement favorable ; par contre, dans les mêmes conditions, la langue adulte, bien que faisant des aphtes typiques, peut être un milieu moins adapté à la culture _in vitro_, car si le virus peut se multiplier sur un tel milieu, il n'est pas certain que le pouvoir antigénique ne subisse pas des modifications indésirables.

L'idéal serait donc d'avoir une méthode de rendement massif _in vitro_, évitant tous les écueils théoriques et pratiques qui furent toujours l'apanage des méthodes _in vivo_, qui permettrait d'obtenir une grande quantité d'un virus d'une très haute virulence et d'un bon pouvoir antigénique.

VI CONCLUSIONS GENERALES

[illegible] et la [illegible], n'est pas [illegible] ; or, de l'obtention de grandes quantités [illegible] viroses.

[illegible] la fièvre [illegible] contagieuse [illegible] chiffrent par dizaines de milliards. La fièvre aphteuse est un fléau international [illegible]

Le virus aphteux est particulièrement intéressant à étudier. Un des plus petits virus, constitué d'une molécule de [illegible] variantes différenciables par leur [illegible]

Les études du virus aphteux sont facilitées par [illegible] manifestations [illegible]

[illegible]

[illegible] principalement [illegible] le virus aphteux.

[illegible]

- [illegible] non cytolytiques.

Nous précisons [illegible] apports originaux :

- les conditions de filtration et de centri[illegible] des suspensions virulentes,
- le pH des lieux de préd[illegible]lection du virus, in [illegible] langue bovine, peau foetale infectée ou non de virus aphteux, ainsi que la persistance du virus d[illegible] certains milieux [illegible],
- l'inactivité du grand froid, ou des ultrasons, sur les suspensions virulentes.

Au point de vue ch[illegible], nous contrôlons que :

- les gaz res[illegible], en particulier l'oxygène (indispensable à la survie des tissus de culture), n'ont pas d'action sur le virus aphteux, alors qu'un milieu réducteur a, contre toute attente, une légère influence défavorable sur ce virus.
- la pénicilline, [illegible] sur le virus aphteux in vitro et in vivo, n'a pas d'action ; elle ne modifie pas l'évolution de la fièvre aphteuse du Cobaye,
- la di[illegible]benzyl-[illegible] a une action viru[illegible]cide in vitro, mais non in vivo, chez le Cobaye,
- [illegible] n'a pas d'action in vivo.
- certains antibiotiques, loin de [illegible] une généralisation, [illegible] quelques maladies infectieuses, [illegible] apparition et la généralisation, [illegible] chez le Cobaye. Cette action est particulièrement [illegible] de di[illegible] [illegible] et surtout pour [illegible] 9 [illegible] 1 4 9 [illegible]. Cette action favorable [illegible]

Au point de vue biologique :

L'observation de l'évolution de la fièvre aphteuse chez les bovins, à la suite de très nombreuses inoculations expérimentales, nous prouve que, contrairement à l'opinion généralement admise, l'apparition d'un ou plusieurs aphtes primaires précède toujours, de quelques heures, l'élévation thermique. L'hypothèse de la formation d'aphtes internes dans les voies digestives peut expliquer pourquoi, dans les conditions naturelles, la fièvre semble précéder les éruptions et pourquoi les animaux sont contagieux avant tout symptôme clinique : fait bien connu, mais qui restait incompréhensible.

Nous nous sommes surtout attaché à l'étude de la culture du virus aphteux.

Le problème de la source du virus aphteux est [illegible] non seulement en vue de [illegible] virus, mais aussi en vue [illegible]

C'est par une connaissance [illegible] que l'on pourra mieux s'en [illegible]

[illegible] en rendent [illegible] en effet, le grand nombre de bovins [illegible] nécessaires [illegible] + 4°, le nombre des variantes [illegible] sont des obstacles qui [illegible] devrait être entrepris [illegible] d'un pays, et [illegible]

Actuellement, [illegible] culture *in vivo*, chez [illegible] pur et dont les quali[illegible] analysées avec rigueur.

Le principe de la culture *in vitro* sur cellules vivantes [illegible] mais le virus de culture [illegible] être exploité qu'avec la méthode de FRENKEL sur explantations d'épithélium de langue bovine, méthode limitée par la préparation du milieu, la quantité de tissu, plus ou moins stérile, recueillie sur chaque langue et le titre du virus de culture.

Nous avons cherché à faire une revue critique, aussi complète que possible, des méthodes connues de cultures du virus aphteux:

- *in vivo*, chez les bovins, avec une étude spéciale de la production des aphtes, et chez les autres espèces animales susceptibles d'être utilisées,
- *in ovo*, par passages du virus directement sur oeufs ou passages alternés avec un animal sensible,
- *in vitro*, dans cette revue qui préface, en quelque sorte, nos expériences personnelles de culture, sont exposés les principes des cultures de virus sur cultures de tissus, les travaux relatifs aux cultures du virus aphteux et une synthèse des conditions et des résultats des cultures du virus aphteux.

Nos recherches sur la culture du virus aphteux ont été dirigées dans plusieurs voies, les unes en équipe, les autres personnelles.

Nous n'avons pas réussi, en collaboration avec J.-Paul THIERY et Léone SALOMON, à cultiver, sur oeufs incubés, les souches de virus aphteux à notre disposition.

Nous avons contribué, pour une certaine partie, à mettre au point, avec le professeur J.-André THOMAS et ses collaborateurs, d'abord la méthode de survie des [illegible] par perfusion [illegible]tique, ensuite deux méthodes nouvelles de culture du virus aphteux:

sur foetus en survie expérimentale,
sur cultures de peaux en liquide amniotique
[illegible]

Ces méthodes sont analysées en détail dans notre travail et leurs résultats sont exposés. Nous indiquons la part que nous avons prise au cours de ces longues recherches poursuivies en équipe.

Le premier stade de la culture du virus aphteux sur foetus en survie expérimentale prouve la possibilité de conserver les cellules du foetus vivantes le temps nécessaire à la culture du virus aphteux.

Il a été indispensable de rechercher les conditions les plus favorables au maintien de la vie tissulaire, tout en conservant un milieu apte à la culture du virus. Dans ce but ont été recherchés, dans de rigoureuses conditions de stérilité, la meilleure voie de perfusion du foetus (artère ombilicale), un milieu de culture adéquat et le mode d'inoculation le plus apte.

Le deuxième temps est la culture proprement dite du virus aphteux : [illegible], lorsque les conditions générales sont convenables (bonne vitalité des tissus foetaux secondaire à la précocité de la mise en survie du foetus, à un lavage de la circulation foetale, à un milieu de perfusion sanguin.

Lors des primo-inoculations sur peaux de foetus, un virus de passage conserve intégralement, en dépit de certaines irrégularités, sa virulence ou même l'accroit.

La multiplication de 400 fois a été obtenue. Le rendement peut atteindre quelques centaines de grammes d'un virus de culture d'un titre élevé.

En collaboration nous avons obtenu, avec facilité, la culture in vitro du virus aphteux sur peau de foetus de vache en liquide synthétique déprotéiné et purifié. Une culture d'un demi-litre produit, en deux jours, le rendement moyen en aphteux d'un bovin (50 gr.)

Personnellement, nous avons cultivé le virus aphteux sur cellules vivantes dans un milieu que l'on peut considérer comme un ultrafiltrat naturel : le liquide céphalorachidien.

Cette méthode originale est d'une très grande simplicité. Elle n'exige que deux produits d'origine bovine tout naturellement préparés : liquide céphalo-rachidien et peaux de foetus, faciles à trouver aux abattoirs. Elle permet d'obtenir, dans le liquide, un virus à peu près débarrassé de protéines étrangères.

Nous avons déterminé les conditions de récolte et de préparation du liquide céphalo-rachidien et des [illegible] culture.

On peut, en effet, recueillir aux abattoirs, en moyenne 200 cc [illegible], de liquide céphalo-rachidien, par la technique que nous avons mise au point.

Le liquide céphalo-rachidien peut être stérilisé sans perdre ses qualités, par la chaleur.

Nous avons réalisé cinq séries de plusieurs passages du virus aphteux (une série atteint 30 passages, une autre, 10).

La culture des trois types de virus aphteux est possible.

Le titre et la virulence s'atténuent au début des passages, mais après adaptation au mode de culture, ils reprennent leurs qualités ; nous observons même une augmentation de la virulence.

Les propriétés pathogènes et immunisantes du virus de culture sont conservées.

Nous nous sommes livré à une étude expérimentale détaillée des conditions de culture du virus aphteux en liquide céphalo-rachidien ; nous avons testé, en vue de telles cultures, différents tissus de foetus (bovin, ovin, porcin), [illegible] conservés selon différents [illegible] et divers liquides organiques tels que les humeurs aqueuse et vitrée de l'oeil, le liquide péricardique de porc.

[illegible] peau de foetus par du sarcome de Rous (tumeur d'origine aviaire), nous [illegible] du virus aphteux.

Le liquide céphalo-rachidien peut être utilisé, dans les milieux, tel qu'il est récolté, congelé, filtré ou autoclavé.

La recherche des conditions générales d'incubation (température, modification de l'atmosphère, rapport tissus/liquide, addition de plasma pour rendre le milieu solide) ont fait l'objet de divers essais.

Les essais de culture du virus aphteux en liquide [illegible] [illegible] sans cellules ont échoué, même si celles-ci étaient séparées du liquide que par une membrane de collodion ; les substances diffusibles ne compensent pas la présence des cellules, nouvelle preuve de leur nécessité pour la culture du virus aphteux.

Au point de vue expérimental, nous pensons que la méthode sur liquide [illegible] et [illegible] de foetus pourra rendre quelques services en raison de la facilité de préparation des [illegible] nécessaires et [illegible] de culture.

Il est précieux d'avoir une méthode de culture [illegible] en milieu [illegible] l'étude expérimentale du virus aphteux.

Les [illegible] pratiques [illegible] [illegible] [illegible], pour l'instant, sur le [illegible] difficile de la culture du virus aphteux [illegible] [illegible] [illegible] conservant toutes ses propriétés [illegible] [illegible] [illegible] [illegible].

B I B L I O G R A P H I E

En raison de son importance, la bibliographie a dû être limitée aux procédés techniques et aux résultats de la culture du virus aphteux.

Pour la bibliographie de la culture des virus en général, se reporter à l'exposé de J. [illegible] (in C. LEVADITI & P. LÉPINE - Les Ultravirus des Maladies humaines, 2ème Edition, Maloine Edit. 1948, p. 1621-1651), et pour celle de la fièvre aphteuse à la publication du Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires du Ministère de l'Agriculture par Louis et Léone SALOMON, 1951, 172 pages.

ANDREWES, C.H. - The application of the method of tissue-culture to some problems in virus pathology. Arch. Exp. Zellforsch., 1934, 15, 437.

ANDREW, H., ECCLES, A., HALL, E.B., FOLDING, J.B., LONGLEY, E.O., HAMILTON, A.A. & GRAHAM, A.M. - The occurrence of virus in the blood, milk and urine of cattle during the course of infection. Fifth Progress Report of the Foot-and-Mouth Disease Research Committee, Stationery Office, London 1937, Appendix I, 104 - 115.

Anonyme.- Das Eidgenossiche Vakzine-Institut in Basel. Verl. Hans Huber, Bern, 1943, 48 p.

Anonyme.- Convention entre les Pays du Sud-est européen pour l'échange des renseignements sur les maladies contagieuses. Bull. Off. Interm. des Epiz., 1943, 22, 273 - 274.

Anonyme.- La conférence de Berne pour la préparation du vaccin anti-aphteux. Bull. Off. Interm. des Epiz., 1946, 25, 219 - 229.

Anonyme.- La conférence de San Salvador et la création de l'Institut Vétérinaire de l'Amérique centrale. Bull. Off. Interm. des Epiz., 1947, 27, 224 - 227.

Anonyme.- La Fièvre aphteuse au Mexique. Bull. Off. Interm. des Epiz. 1947, 27, 308-313, 1948, 29, 221-223, 273-274, 1950, 33, 509-515, 605-606.

Anonyme.- Procès-verbal de la Conférence convoquée à Berne par l'Office International des Epizooties pour l'étude de l'uniformisation des méthodes de préparation du vaccin anti-aphteux. Bull. Off. Interm des Epiz., 1947, 27, 507 - 532.

Anonyme.- Procès-verbaux des séances de l'Office International des Epizooties. Bull. Off. Interm. des Epiz., 1938, 16, 325-329, 1939, 18, 389-494, 1945, 24, 1-5, 1947, 28, 242-249.

Anonyme.- Mesures propres à assurer la prophylaxie et [illegible]

de la fièvre aphteuse et de la peste bovine. Bull. Off. Intern. des Epiz., 1948, 29, 273-274.

Anonyme.- Production du vaccin anti-aphteux. Bull. Off. Intern. des Epiz., 1948, 29, 304.

Anonyme.- Animal Medicine vital to our economic System. J. Amer. Vet. Med. Ass., 1948, 112, 195.

Anonyme.- Commission permanente pour l'étude des problèmes techniques que pose la vaccination anti-aphteuse. Session du 13 au 16 mai 1950 (Paris). Bull. Off. Intern. des Epiz., 1950, 33, 450-462.

Anonyme.- Rapport de la réunion de la fièvre aphteuse organisée conjointement par l'Office International et l'Organisation des Nations-Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture. Bull. Off. Intern. des Epiz., 1950, 33, 598-601.

Anonyme.- Station de recherches sur la fièvre aphteuse. Veterinary Record, 1950, 62, 475.

ARAMBURU, G.- Determinacion de la presencia del virus aftoso en el liquido amniotico de cobayo. Informe de la Direccion de Patologia animal. Division fiebre aftosa, 1944-1945. Buenos-Aires 1947, 61 p.

ARAMBURU, G.- Inoculacion de gruesos en cobayos con virus aftoso. Comparacion de differentes methodos. Publication del Laboratorio des Investigaciones, n° 9, Buenos-Aires, 1949.

ARAMBURU, G.- A comparison of different methods of inoculating guinea-pigs with the virus of foot-and-mouth disease. J. Comp. Path. Therap., 1949, 59, 42-47.

ARKWRIGHT, J. & BURBURY, M.- Transmission of foot-and-mouth disease to rodents. J. Comp. Path. and Therap. 1925, 38, 229-238.

BARDACH, M.- Recherches sur la fièvre aphteuse. Une source abondante de virus, le liposarcome greffable du cobaye. C.-R. Acad. Sc., 1946, 222, 1146-1148.

BARSKI, G.- Généralisation de l'infection au virus vaccinal sous l'effet de la N-diméthylamino-méthyléthyl-dibenzo-parathiazine. C.-R. Soc. Biol., 1949, 143, 1568-1571.

BARSKI,G.,& MAURIN,J.- Cultures sur membranes plastiques en milieu liquide de différents tissus nerveux et mésenchymateux.Ann.Inst. Pasteur,I948,74,312-321.

BARTELS,W.- Jokénon Neuigkeiten.I842,NOI.

BARTOLUCCI,M.- Notes épidémiologiques sur la fièvre aphteuse. Rev.Vet. I910,593-598.

BASSET,J.- Vaccins anti-aphteux. A propos des expériences de Cortez sur le vaccin Belin. Bull.Acad.Vétér.France,I949,22,43-45.

BASSET,J.- Vaccins anti-aphteux.Origine des anticorps immunisants et mécanisme de l'immunité dans les viroses. Bull.Acad.vétér.France, I947,20,442;I948,21,310;I949,22,43; I949,22,237; I950,23,57.

BAUER,D.J.- Multiplication of the animal viruses. Nature,I949,164, 767-771.

BEAUFRERE,P.- Rapport sur les opérations du Service Sanitaire vétérinaire de Paris et du Département de la Seine pendant l'année I947, Chaix.Impr.Paris I948.

BECKER,- Ist die Maul-und Klauenseuche auf Kaninchen ubertragbar. Der Kaninchenzuchter.I9[illegible],I2,552.

BEDSON,S.P.,BURBURY,Y.M.,& MAITLAND,H.B.- Observations on Foot-and Mouth diseases, Attempted cultivation of Foot-and Mouth Disease virus. First Progress Report of the Foot-and Mouth Disease Research Committee,Stationery Office,London,I925,II et 29.

BEDSON,S.P.,& MAITLAND,H.B.- Observations on foot-and mouth disease II,the attempted cultivation of the virus and its reaction to various agents,chemical and physical. J.comp.Path.Therap.,I925,38, 2[illegible]-254.

BEDSON,S.P.,MAITLAND,H.B.,& BURBURY,Y.M.- Further observations on Foot-and Mouth Disease,J.comp.Path.u Therap.,I927,40,5-36 & [illegible]-II7.

BEDSON,S.P.,MAITLAND,H.B.,& BURBURY,Y.M.- Behaviour of Foot-and Mouth Disease virus in culture media. Second Progress Report of the Foot-and Mouth Disease Research Committee Stationery Office,London,I927, 75-79.

BELIN,Cl.- Des quantités et de la valeur infectante du virus aphteux obtenu par la méthode des complexes vaccino-aphteux.C.R.Acad.Sci., 1950,230,2055-2056.

BELIN,Cl.- De la [illegible] du virus aphteux des complexes vaccino-aphteux. Bull.Acad.Vétér.France.,I950,23,340-342.

BELIN, M.- Etude de la culture simultanée de deux virus filtrants dermotropes. C.R. Soc. Biol., I925, 93, I488-I490.

BELIN, M.- Des [illegible] de l'évolution vaccino-aphteuse chez le cobaye. Soc. Biol., [illegible]

BELIN, M.- Conservation et [illegible] de la virulence du virus aphteux par cultures simultanées avec le virus vaccinal. Soc. Biol., I926, 94, 8I6-8I8.

BELIN, M.- Contribution à l'étude des complexes vaccino-aphteux. Soc. Biol., [illegible]

BELIN, M.- Du choix des complexes vaccino-aphteux pouvant être utilisés comme vaccin anti-aphteux. Soc. Biol., I926, 95, I533-I535.

BELIN, M.- De la culture simultanée de deux ultra-virus dermotropes. Etude des complexes vaccino-aphteux. Thèse Doct. vétér. Alfort, [illegible]

BELIN, M.- Etude des complexes vaccino-aphteux. Bull. Acad. Méd., I938, I20, 404-406.

BERGER, H.- La fièvre aphteuse aux Pays-Bas dans les années I939-I940. Bull. Off. Intern. des Epiz., I94I, 20, I8I-I93.

BEVERIDGE, W. I., BURNET, F. M.- La culture des virus et des rickettsies dans l'embryon de poulet. Flammarion Edit. Paris I950.

BERNARD, R., [illegible], [illegible] & LORRIN, R.- Observation du virus de la fièvre aphteuse au microscope électronique. C.R. Acad. Sci., [illegible]

[illegible] - Ein Versuch zur Züchtung von Aphthenlymphe. Münch. tierärztl. Wochenschr., I92I, 57-58.

[illegible], O.- [illegible] von Kot und Harn bei Maul-und Klauenseuche [illegible] Schweinen und Rindern und. [illegible], I923, 39, 2I0.

[illegible] - [illegible] Revista de Medicina Veterinaria [illegible]

[illegible] - [illegible] über Maul-und Klauenseuche. Deutsch. tierärztl. Wochenschr., I923, 3I, 80 et 233-237.

BLIECK (de), & [illegible] - Mond en Klauwzeer Onderzoekingen. Tijdschrift voor Diergeneeskunde, I923, 50, [illegible]

[illegible], G. P.- Viruses culture modified technic of culture shell for virus culture. Science, I944, I00, I55-I56.

BODENMULLER,- Aphtenseuche eines Foeutu.Wochenschr.Thierheilkde., 1896.

BOMS,P.- Die Trennung des Vakzinevirus vom virus des Maul-und Klauenseuche durch Züchtung.Thèse Doct.vétér.Hanovre,1936.

BOMS,P.,& TERHEBRUGGE,H.- Die Trennung des Pockenvirus vom Virus der Maul-und Klauenseuche mittels physikalischer chemischer und biologischer Methoden.Zentralbl.Bakt.,1936,138,319.

BORGILA,J.- Die Züchtung des Maul-und Klauenseuchevirus in Gewebekulturen auf Zellophanmembranen.Zentralbl.Bakt,1936,Orig.136,389.

BORG,W.- Behandling af Pattesear ved Mund-og Klovasyge.Swensk Veterinärtidskrift,1939,129.

BORREL,A.- Technique simple pour la culture de tissus normaux ou de cellules cancéreuses. C.R.Soc.Biol.,1926,95,964-965.

BORREL,A.- Surcoloration et microbes invisibles. C.R.Soc.Biol.,1932, III,925-926.

BORREL,A.- Culture des tissus et surcoloration. C.R.Soc.Biol.,1932, III,923-924.

BORREL,A.- Surcoloration et virus aphteux. C.R.Soc.Biol.,1932,III, 926-928.

BOSHJAN,G.- De la nature des virus et des microbes. Edition d'Etat des ouvrages médicaux,U.R.S.S.,1950.

BOYNTON,W.H.- Preliminary report on the propagation of hog cholera virus in vitro.Veter.Med.,1946,41,346-347.

BOYNTON,W.H.,TAKAHASHI,G.M.,WOODS,G.M.,& WALKER,W.W.- Further studies on propagation of hog Cholera virus in vitro Including Electron Micrographs.Veter.Med.,1948,43,403.

BRAGA,A.- Notas Cyto-biologicas (contulmicas à technica de histocultura e virus-cultura) Boletin do Instituto Vital Brazil.1939,N°22,5.

BREVOT,G.- Rapport sur les opérations des Services Sanitaires Vétérinaires de Paris et du Département de la Seine pendant l'année 1949. Chaix Impr.Paris 1950.

BRIDRE,J.,& BARDACH,M.- Recherches sur la fièvre aphteuse.Pouvoir pathogène et valeur antigénique du virus recueilli dans une tumeur de cobaye aphteux.C.R.Acad.Sci.,1946,222,1189-1191.

BRIDRE,J.,BARDACH,M.,& RINJARD,P.- Recherches sur la fièvre aphteuse. Essais de vaccination des bovidés avec du tissu néoplasique du cobaye aphteux.C.R.Acad.Sci.,1946,222,1415-1416.

BRION,A.,& GORET,P.- Les échanges immunitaires entre la mère et le foetus ou le nouveau-né.Rev.Immunol.et Thérap.,1949,13,325-37

BROOKSBY,J.B.- The survival of the virus foot-and mouth disease in blood at 37°C.Brit.J.exp.Path.,1948,29,10-19.

BROOKSBY,J.B.- The antibodies in Foot-and Mouth disease.London: His Majestys stationery Office,1949.

BUNIVA,- Ragionamento sull'excidio d'ongi bovina sospetta et infecta.Torino 1798.

BUNIVA,- Calendario della Soc.Agraria di Torino,1812.

BURBURY,Y.M.- Survival of Foot-and Mouth disease virus when dried upon various materials.Third Progress Report of the Foot-and Mouth disease Research Committee Stationery Office London 1928, Appendix II,84.

BURBURY,Y.M.- Attempts to cultivate the virus of Foot-and Mouth disease at ion Oxygen potential.Third Progress Report of the Foot-and Mouth disease Research Committee,Stationery Office, London,1928,93-95.

BURNET,F.M.- The growwth of viruses on the chorioallantois of the chick embryo-in; Doerr R.und Hallauer,C.Handbuch der Virus forschung.419-446.Wien 1938,Ed.Julius Springer.

BURNET,F.M.,& GALLOWAY,I.A.- The propagation of the virus of Vesicular Stomatitis in the developing Hen's Egg.J.exper.Path. 1934,15,105.

BUSSARD,A.,BEQUIGNON,R.,& LAMY,R.- Contribution à l'étude de la rage.III.de la présence de la hyaluronidase dans la bave du chien normal.Ann.Inst.Pasteur.,1949,77.183-187.

CARRE,H.- Quelques considérations sur les virus filtrants. Rev. génér.Méd.vétér.,1909,13,433-442.

CARREL,A.- Neue Untersuchungen über das selbständige Leben der Gewebe und Organe. Berl.Klin.Wochenschr.,1913,56,1097.

CARREL,A.- Tissue culture and cell physiology.Physiol.Rev.1924, 4,1-20.

CARREL,A.- Some conditions of the reproduction in vitro of the Roux virus.J.exp.Med.,1936,43,647.

CARREL,A.- Modern techniques of tissue culture and results.Arch. exp.Zellforsch.,1928,7,70.

CARREL,A.- Filterable virus. In T.N.Rivers,Willims et Wilkins, Baltimore,1928,97.

CARREL,A.- La technique de la culture des tissus en goutte pendante C.R.Soc.Biol.,1929,102,742-744.

CARREL,A.- The culture of wohle.Organs I. Technique of the culture of the tyroid gland.J.Exp.Med.,1937,65,515-526.

CARREL,A.- La culture des viscères dans l'appareil de Lindberg. Paris Médical,1937,27,85-86.

CARREL,A., BURROWS,M.T., & MONTROSE,- La culture des tissus adultes en dehors de l'organisme. C.R.Soc.Biol.,1910,69,2[illegible]3-296.

CARREL,A., & LINDBERGH,C.A.- The culture of wohle Organs. Science, 1935,81,621-623.

CARREL,A., & LINDBERGH,C.A.- The culture of organs.Hamisch Hamilton medical books Edit.London,1938,221 pp.

CARREL,A., & RIVERS,T.M.- La fabrication du vaccin in vitro. C.R.Soc. Biol.,1927,96,848-850.

[illegible]ROVSKY,J.- Bericht über Tilgung der Maul-und Klauenseuche in Deutschland,Dänemark,und Holland. Prager Tierärztl.Arch.,1933,13,4,[illegible]

[illegible]VINKA,V.- Versuche zur Züchtung des Maul-und Klauenseuchevirus Zverolek.Rezpr.,1930,20.

[illegible]DIEK,G.- Symbiose "in vitro" du virus claveleux et du virus aphteux ;description simultanée des deux virus par le carbone animal. Rec. Med.Vetér.,1940,116,254-261.

[illegible] Le vaccin [illegible] (complexe vaccino aphteux) dans la vaccination contre la fièvre aphteuse. Bull.Acad.vetér.France,1949, [illegible]

[illegible]CO,U., & AGUZZI,A.- La virulenza del sangue degli animali malatti di afta epizootica. Clinica vet.,1916,38,1[illegible]3-195.

[illegible]CO,U., & AGUZZI,A.- Sur la virulence du sang des bovidés aphteux et essais d'immunisation contre la fièvre ophteuse. Rev.génér.Méd. vetér.,1918,[illegible]-245.

CRACIUM,E.C.- La culture des tissus en biologie expérimentale,Paris, 1931,Masson et Cie Editeurs.442 pp.

CURASSON,G.- Maladies infectieuses des animaux domestiques. Vigot Edit. Paris.1946,[illegible]

DAHMEN,H.- Züchtung und Morphologie des Erregers der Lungenseuche und der Maul-und Klauenseuche.Zentralbl.Bakt.,1924,93,Orig.125-130.

DAHMEN,H.- Die Züchtung des Maul-und Klauenseucheerregers.Zentr.Bl. Bakt.,1924,Réf.,76,382-383.

[illegible] La fièvre aphteuse [illegible] 70, I37-I40 et 20I-2I6. et Revue Vétér., I[illegible]4, 70, I37-I40 et 20I-2I5.

DELAFOND,- Police sanitaire, I836, 2, Fièvre apjteuse : [illegible]

DELAUNAY, A., FASQUELLE, R., [illegible] DELAUNAY, [illegible] - Les facteurs de [illegible]sion. Revue Scientifique, I947, n°3262-3263 : I007.

DELAUNAY, A., [illegible] VOISIN, G.- Les Hyaluronidases et leurs pro[illegible] [illegible]

[illegible]

DU[illegible]LOUX, [illegible]RD, P., [illegible] CORDIER, G.- Symbiose in vivo du virus [illegible]veleux et du virus aphteux. C.R.Acad [illegible]

DU[illegible]OT, [illegible]- Influence des antihistaminiques de synt[illegible] [illegible]volution de l'infection microbienne expérimentale. C.[illegible] [illegible] I43, I577 [illegible]

DURAN-REYNALS, F.- Exaltation de l'activité du virus vaccin[illegible] [illegible] J.Exper.Med., I929, 50, 327., Rev.Bacter., I942-I943.

EAG[illegible], G.H., [illegible]CLEAN, A.- Further studies on the cultivation of Vaccinia virus. Brit.J.Exper.Path., I930, II, 337-347.

EAGLES, G.H., [illegible] KORDI, [illegible] - The cultivation of vaccinia [illegible] a new series of sub-cultures in cell-free medium. Proc Roy Soc.Med., I932, [illegible], 32[illegible]-337.

[illegible] The cultivation of [illegible] further [illegible] with cell-free medium. Brit.J.Exper.Path., I935, I6, [illegible]

[illegible] The [illegible] of the Foot-and-Mouth [illegible] its significance in determining the conditions required for the survival and growth of the virus. Fourth Progress Report of the Foot-and Mouth Disease Research Committee. Stationery Office London I931. Appendix II, I0 et I50-20[illegible].

EPHRUSSI, B.- La culture des tissus. Paris I932, Gauthier-Villars et Cie Edit. 235 pp.

[illegible] - Sur l'[illegible] des [illegible] Giornale di Vet. [illegible] et Rec.Med.Vétér., I858, 35, 473-475.

ERNST, W.- Der Erreger der Maul-und Klauenseuche : Frosch und [illegible] deutsches [illegible]forschung. [illegible] Wochenschr., I924, 7[illegible], 377.

[illegible]

[illegible]

[illegible] and in Th[illegible]

[illegible] - Lutte internationale contre la fièvre [illegible]

[illegible] - Conférence [illegible] 1007 [illegible] Bull. Off. intern. des Epiz. [illegible]

[illegible] Bull. Off. intern. des Epiz. [illegible]

[illegible] vinteux [illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible] Bull. Off. intern. des Epiz. [illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]
27,201-220.

FORGEOT,P.- Vaccination contre les ultravirus par vi[illegible]
Bull.Acad.Vét.de France,1948,21,201-206.

[illegible]
rigine microbienne des animaux domestiques.Johanet Ed.[illegible]
1935,1091.

FREI,W.- La production du virus.Bull.Off.intern.des Epiz.,[illegible]
[illegible]

FRENKEL,H.S.- Une nouvelle méthode de culture de tissu dan[illegible]
[illegible]

[illegible]

[illegible]
met mond-en Klauwzeervirus vatbaar.Verslag over de Wer[illegible]
van het Staats veeartsenijkundig Onderzoekingsinstituut [illegible]

FRENKEL,H.S.- Over het Kweeken van mond-en Klauwzeervirus [illegible]
[illegible]
Staats veeartsenijkundig Onderzoekingsinstituut,1933-34,88-[illegible]

[illegible]
[illegible]
neene Landsdrukkerij,S.Gravenhage,1934.

FRENKEL,H.S.- Over virus-onderzoek.Tijdschrift voor Diergenees-
kunde,1934,61,1081.

FRENKEL,H.S.- Over het Kweeken van mond-en Klauwzeersmetsel op
buitenplantation van runderembryo's.welke gedurende eenige da[illegible]
door Koude geconserveerd waren.Verslag over de Werkzaamhed[illegible]
van het Staats veeartsenijkundig Onderzoekingsinstituut.S.[illegible]
venhage.1935,22-25.

FRENKEL,H.S.- Mond-en Klauwzeervirus in Kunstmatig [illegible]
Tijdschrift voor Diergeneeskunde,1936,63,973-984

[illegible]cherches sur la fièvre aphteuse exécutées [illegible]
[illegible]n de l'Office international des Epizootie[illegible]
[illegible] Epiz.,1937,14,345-350.

FRENKEL, H.S.- Les méthodes de culture des virus filtrables et du virus aphteux en particulier. Bull.Off.Intern.des Epiz.,I937,I4, 203-2[illegible].

FRENKEL H.S.- Les méthodes de culture des virus filtrables et du virus aphteux en particulier. Algemeene Landsdrukkerig,I93[illegible],7.

FRENKEL,H.S.- [illegible] getroffen in verband met de heerschende mond-en Klauwzeer [illegible] I937.Tijdschrift voor Diergeneeskunde [illegible],7I-76.

FRENKEL,H.S.- Rapport betreffende de proeven un de praktijk [illegible] met het op de [illegible] huid van [illegible] en [illegible] Klauwzeervirus.Verslag over de Weekzaamheden van het [illegible] senijkunde Onderzoekingsinstituut,I936,36-53.

FRENKEL,H.S.- The [illegible] of the virus Foot-and Mouth [illegible] Internat Congr.Microbiol.Rep.Proc.,(New-York), I939,[illegible]

FRENKEL,H.S.- La culture du virus de la fièvre aphteuse sur l'épithélium de la langue des bovidés. Bull.Off.Intern.des [illegible],I947,[illegible], I95-I62.

FRENKEL,H.S.- Culture du virus. Chem.WBL. Nederl.,I948,44,39I-3[illegible]

FRENKEL,H.S.- [illegible] changes in explanted bovine epithelial [illegible] [illegible] the virus of Foot-and Mouth disease. Amer.[illegible]

FRENKEL,H.S.- Recherches sur la fièvre aphteuse. Culture du virus [illegible] des lambeaux d'épithélium lingual explanté des bovidés. Bull.Off. Intern.des Epiz.,I95I,35,n°5-6,306.

FRENKEL,H.S.,[illegible],H.W.,& [illegible] Foot-and mouth disease [illegible] propagation.J.Amer.Vétér.Med.Ass.,I949,II5,n°870,I78.

FRENKEL,H.S.,& FREDERICKS,H.H.J.- Cultivation of Foot-and Mouth disease virus in explanted epithelial tissue of the bovine rumen. Nature. I949,I64,235-236.

FRENKEL,H.S.,& WAVEREN,G.M.(van).- Vermeerdert het virus van mond-en klauwzeer zich [illegible] kippen-ei " Verslag over de Weekzaamheden van het Staats veeartsenijkundig Onderzoekingsinstituut.S.Gravenhage.I934,46-56.

FRENKEL,H.S.,& WAVEREN,G.M.(van).- [illegible] culture de l'agent de la fièvre aphteuse " in vitro ".I935,S.Gravenhage,I2 pp.

FRENKEL,H.S.,& WAVEREN,G.M.(van).- Over het kweeken van mond-en klauwzeersmetstof op huid-explantaten van runder en schapenembryo's Verslag over de Weekzaamheden van het Staats veeartsenijkundig Onderzoekingsinstituut. S.Gravenhage I935,[illegible]

FRENKEL, H.S., & WAVEREN, G.M. (van).- Beinvloeding der mond-en Klauenzeer virus door cantharideblaren. Verslag over de Weekzaamheden van het Staats veeartsenijkundig Onderzoekings-instituut, over I935, S. Gravenhage I935.

FRENKEL, H.S., & WAVEREN, G.M. (van).- Over het Kweeken van mond-en Klauwzeersmetstof in vitro. Verslag over de Weekzaamheden van het Staats veeartsenijkundig Onderzoekingsinstituut. S. Gravenhage, I935, Tijdschrift voor Diergeneeskunde I935, 62, 233-243.

FRENKEL, H.S., & WAVEREN, G.M. (van).- Infectieproeven met mond-en Klauenzeer virus op apen, Verslag over de Weekzaamheden van het Staats veeartsenijkundig Onderzoekingsinstituut over I935. S. Gravenhage, I935.

FRENKEL, H.S., & WAVEREN, G.M. (van).- Die Züchtung des Ansteckungs-stoffes der Maul-und Klauenseuche auf Hautexplantaten von Rinder und Schafembryonen Münch. tierärztl. Wochenschr., I936, 87, 86-89.

FRENKEL, H.S., & WAVEREN, G.M. (van).- Beinvloedning der mond-en klauwzeervirus door canthariden blaren. Verslag over de Weekzaamheden van het Staats veeartsenijkundig Onderzoekings-instituut. S. Gravenhage I936, 26-29.

FRENKEL, H.S., & WAVEREN, G.M. (van).- Over intracutane entingen met mond-en Klauenzeervirus bij kalveren en varkens. Tijdschrift voor Diergeneekunde, I937, 64, 577.

FRENKEL, H.S., & WAVEREN, G.M. (van).- La culture du virus de la fièvre aphteuse dans les explantations de la peau embryonnaire porcine. Bull. Off. Intern. des Epiz., I937, I4, 35I-352.

FRENKEL, H.S., & WAVEREN, G.M. (van).- La culture du virus de la fièvre aphteuse dans les explantations embryonnaires porcines. Bull. Off. Intern. des Epiz., I937, I5, 345-346.

FRENKEL, H.S., & WAVEREN, G.M. (van).- La culture du virus de la fièvre aphteuse dans les explantations de la peau embryonnaire porcine, Verslag over de weekzaamheden van het Staats veeartsenijkundig Onderzoekingsinstituut, S. Gravenhage, I938, I7

FRENKEL, H.S., WAVEREN, G.M. (van).- Over het Kweeken van mond-en Klauwzeersmetstof op huidexplantaties van runder-en schapenfoetera. Verslag over de weekzaamheden van het Staats veeartsenijkundig Onderzoekingsinstituut over I936 en I937, S. Gravenhage I938, 29-3I.

FRENKEL, H.S., & WAVEREN, G.M. (van).- Verdere onderzoekingen het Kweeske in vitro van het mond-en Klauwservirus. Verslag over de weekzaamheden van het Staats veeartsenijkundig Onderzoekingsinstituut over I936 en I937. S. Gravenhage I938, 32-35.

FRENKEL,H.S.,& WAVEREN,G.M.(van).- Over intracerebrale enting met mond-en Klauwzeervirus bij kalveren en varkens.Verslag over de Werkwaamheden van het Staats veeartsenijkundig Onderzoekingsinstituut over 1936 en 1937.S.Gravenhage,1938,54.

FRENKEL,H.S.,& WAVEREN,G.M.(van).- Intracerebrale enting van in vitro gekweekt mond-en Klauwzeervirus bij cavias.Verslag over de Werkzaamheden van het Staats veeartsenijkundig Onderzoekingsinstituut over 1936 en 1937,S.Gravenhage,1938,58.

FRENKEL,H.S.,& WAVEREN,G.M.(van).- Immunisations atieproben verricht met gekweekt Mond-en Klauwzeer virus.Verslag over de Weekaamheden van het Staats veeartsenijkundig Onderzoekingsinstituut.S.Gravenhage,1938,264-281.

FRENKEL,H.S.,& WAVEREN,G.M.(van).- Essais d'immunisation avec le virus aphteux cultivé sur des explantations de la peau embryonnaire bovine.Bull.Off.Intern.des Epiz.,1938,16,217-225.

FROSCH,P.- Die Morphologie des Maul-und Klauenseucheerregers.Zentralbl.Bakt.,1924,ref.76,383-384.

FROSCH,P.,& DAHMEN,H.-Maul-und Klauenseuche.Zentralbl.Bakt.,1924, Réf.77,58.

FROSCH,P.,& DAHMEN,H.- Die Morphologie und Kultur des Maul-und Klauenseucheerregers.Arch.Prakt.Tierheilkde.,1924,51,99-122.

FROSCH,P.,& DAHMEN,H.- The virus of Foot-and Mouth Disease. Lancet, 1924,1329.

FROSCH,P.,& DAHMEN,H.- Ueber die Züchtung und die Morphologie des Erregers der Maul-und Klauenseuche.Deutsch.tierärztl.Wochenschr., 1924,32,365-368.

FROSCH,P.,& DAHMEN,H.- Nachprüfung der Frosch-Dahmenschen Kulturversuche.Deutsch.tierärztl.Wochenschr.,1924,32,709-712.

FROSCH,P.,& DAHMEN,H.- Die Entdeckung des Maul-und Klauenseucheerregers Bericht über die Sitzung der Berliner Mikrobiologischen Gesellschaft.7 April 1924.Berl.tierärztl.Wochenschr.,1924,40,185-87.

FROSCH,P.,& DAHMEN,H.- Zur Morphologie und Züchtung des Maul-und Klauenseucheerregers.Berl.tierärztl.Wochenschr.,1924,40,273-274.

FROSCH,P.,& DAHMEN,H.- Der Erregers der Maul-und Klauenseuche. Berl. tierärztl.Wochenschr.,1924,40,341,343 et 662.

FROSCH,P.,& DAHMEN,H.- Der Maul-und Klauenseuche Erregers.Berl.tierärztl.Wochenschr.,1924,40,572.

FROSCH,P.,& DAHMEN,H.- Erklärung zu dem Berich der Kommission.Zentralbl.Bakt.,1925,Réf.78,328-331 et Berl.tierärztl.Wochenschr., 1924,40,662-663.

GALEA,M. - Essais de culture du virus aphteux dans l'encéphale du cobaye. C.R.Soc.Biol.,I932,I09,I9-2I.

GALLOWAY,I.A. - Experiments made in attempting to increase the incidence of spontaneous transmission of the disease from infected to normal guinea-pigs. Fourth Progress Report of the Foot-and Mouth Disease Research Committee, Stationery Office,London,I93I,Appendix III,302-305.

GALLOWAY,I.A. - Attempts to propagate the virus of Foot-and Mouth Disease in eggs. Fifth Progress Report of the Foot-and Mouth Disease Research Committee, Stationery Office. London, I937,Appendix III,I5-I6 et 369-376.

GALLOWAY,I.A.,& ELFORD,W.J. - The differenciation of the virus of Vesicular Stomatitis from the virus of Foot-and Mouth Disease by filtration. Brit.J.Exp.Path.,I933,I4,400.

GALLOWAY,I.A.,& ELFORD,W.J. - Further studies on the differentiation of the virus of vesicular stomatitis from that of Foot-and Mouth disease, with particular to the technique of a rapid and certain method of resolving mixtures of the two viruses. Fifth Progress Research of the Foot-and Mouth disease Research Committee, London, I937,3I3,Appendix III,3I3.

GARD - Culture virus in vitro methods. Nord.Med.(Hygea)I944,2I, 383-387.

GASTINEL,P.,& FASQUELLE,R. - Généralités sur les Ultra-virus. Monographie de l'Encyclopédie Médico-chirurgicale,Paris,I946, I20 pp.

GERLACH,F. - Ueber Versuche zur Sichtbarmachung und Züchtung spezifischer Mikroorganismen bei Virus Infektionskrankheiten und bösartigen Geschwülsten. Wien.tierärztl.Wochenschr.,I938, 25,I65-I86.

GEY,G.O. - An improvised technic for massive tissue culture. Amer.J.Cancer,I933,I7,752-756.

GINS,H.A. - Zu dem Erreger der Maul-und Klauenseuche. I.-Bericht über das Ergebnis der Nachprüfung der Frosch-Dahmenschen Kulturversuche des Maul-und Klauenseuchevirus. Berlin.tierärztl. Wochenschr.,I924,40,66I-662.

GINS,H.A. - Bericht über das Ergebnis der Nachprüfung der Frosch Dahmenschen Kulturversuche des Maul-und Klauenseuche. Zeitschr Veterinärkde.,I925,37,I8.

GINS,H.A. - Bericht über das Ergebnis der Ergebnis der Nachprüfung der Frosch-Dahmenschen Kulturversuche des Maul-und Klauenseuchevirus. Zentralbl. Bakt.,I925,Réf.,78,326-328.

GINS,H.A.,& FORTNER,J. - Experimentelle Maul-und Klauenseuche beim Kaninchen. Berl.tierarztl.Wochenschr.,I926,42,89-90.

GINS,H.A.,& WEBER,R.- Ueber experimentelle Maul-und Klauenseuche. Zentralbl.Bakt.,1922,Ref.73,242.

GINS,H.,& WEBER,R.- Ueber experimentelle Maul-und Klauenseuche. Zentralbl.Bakt.,1922,88,180-185.

GIRARD,H.- Ce que sera en 1948 l'Institut français de la Fièvre aphteuse.Bourgelat 1948,n°I.

GIRARD,H.,HIRTZ,J.,& MACKOWIAK,C.- De la notion de seuil en matière fièvre aphteuse.Bull.Off.Intern.des Epiz.,1950,33,581-587.

GIROUD,P.,& JEZIERSKI,A.- Essai de culture in vivo sur le lapin du virus aphteux "C". C.R.Soc.Biol.,1947,141,1180-1181.

GIROUD,P.,& JEZIERSKI,A.- Comportement sur le poumon de lapin du mélange du virus aphteux C et des Rickettsies du typhus épidémique. C.R.Soc.Biol.,1947,141,1181-1182.

GIROUD,P.,& JEZIERSKI,A.- Comportement de divers petits animaux à l'inoculation de virus aphteux "C" après passages alternés sur les Lapins. C.R.Soc.Biol.,1948,142,1474-1476.

GIROUD,P.,& JEZIERSKI,A.- Pouvoir antigène et vaccinant de la souche de lapin virus aphteux sur cobaye et sur mouton. C.R.Soc.Biol., 1947,141,1182-1186.

GOODPASTURE,E.W.- Some uses of the chick embryo for the study of infection and immunity. Amer.J. Hyg.,1938,28,III.

GOODPASTURE,E.W.,& ANDERSON,K.- Virus infection of human fetal membranes grafted on chorioallantoic of chick embryos. Amer.J.Path., 1942,18,[illegible]

[illegible] Virus infection of the mammalian foetus. Science, 1942,95,[illegible]

GOODPASTURE,E.W.,[illegible] - Vaccinal infection of the chorio-allantoic membrane of the chick Embryo.Am.J.Path.& Bact.,[illegible]

GORET,P.- La culture des ultra-virus des maladies animales. Quelques applications pratiques. Rev.Med.vétér.,1947,98,162-169.

[illegible] - [illegible] sur la constitution,la nature et l'origine des ultra-virus. Rev.Vétér.Militaire., 1947,3,192-214.

GRÉGOIRE,Ch.- Microscopie électronique et recherche biologique. 1950,Masson et Cie, Paris.,Editions Desoer,Liège.

GREEN,R.G.- On the nature of virus adaptations. [illegible], [illegible]

GURSEL,A.- Recherches expérimentales sur la transmission de l'immunité anti-aphteuse de la mère au jeune. Thèse Doctorat Vétérinaire Paris.(Dactylographiée).

GUTH,F.- Zur Züchtung des Erregers der Maul-und Klauenseuche.Deutsch.Med.Wochenschr.,I924,50,707.

HAAN,J.(de).- Die Züchtung von Gewebe ausserhald des Körpers mittels einer Durchströmungsmethode.Nederl.Tijdschr.Geneesk.I922,68,2I08. et Arch.Néerl.Physiol.,I922, 6,388., et Bull.Hist.appli.,I927,4,293-3I7.

HAAN,J., & MAAS,- Die aktive Immunisierung gegen maul-und [illegible] Köbe,Berlin.Münch.tierärztl.Wochenschr.,I939,47,I65-I66.

HAGAN,W.A.- The necessity for research on Foot-and Mouth Disease. J.Amer.Vet.Med.Ass.,[illegible]

HAAGEN,E.(von).- Ueber die Notwendigkeit lebenden Zellen zur Virus züchtung Weitere Untersuchungen über das Gelfieder,variola, vakzine und Herpesvirus.Zentralbl.Bakt. I933.,I29,237-254.

HALLAUER,C.- Die Viruszüchtung im Gewebsexplantate in Boeer H. et Hallauer.C.Handbrich der Virus forschung Wien Julius Springer,I938,369,4I[illegible].

[illegible] antihistaminique de synthèse dans la généralisation de l'infection locale.C.R.Soc.Biol.,I949,I43,I563-I565.

HARRISSON,R.G.- Observations [illegible] developing nerve fibre,Proc.Exp.Biol.and [illegible]-I907,4,I40-I43.

HAUDUROY,P.- Les ultravirus pathogènes et saprophytes. [illegible]

[illegible] téries visibles.Bull.Acad.Med.Fr[illegible]

[illegible],F.- Züchtungsversuche des Ma[illegible] in Gewebskulturen.Zentralbl.[illegible]

HECKE,F.- Weitere Mittei[illegible] des Maul-und Klauenseuchevirus in Gewebskulturen. Zentralbl.Bakt.,I93I,Orig.II9,385-[illegible].

HECKE,F.- Züchtung des Maul-und Klauenseucheerregers. Deutsch. tierärztl.Wochenschr.,1931,39,258-260.

HECKE,F.- Die Eignung verschiedener Gewebsarten zur Züchtung des Maul-und Klauenseuchevirus.Zentralbl.Bakt.,1932,Orig.125,321-329.

HECKE,F.- Studien über die Künstliche Vermehrung des Maul-und Klauenseuchevirus in Gewebskulturen.Zentralbl.Bakt.,1932,Orig.126, 93-101.

HECKE,F.- Erfahrungen mit dem Verfahren von Maitlands zur Künstlichen Vermehrung des Maul-und Klauenseuchevirus in Gewebskulturen. Zentralbl.Bakt.,1933,Orig.128,336-341.

HECKE,F.- Das Virusproblem bei Maul-und Klauenseuche.S.58.Habilitations schrift,Berlin,1936.

HECKE,F.- Das Virus problem bei Maul-und Klauenseuche.Zeitschr. Infektionskr.u.Hyg.Haustiere.1937,50,251-297.

HECKER,- Arbeiten zur Erforschung der Maul-und Klauenseuche.Besondere Beilagen zu dem Voröffentlichungen des Kaiserl. Gesdh. amtes.1898,5,105-108.

HECKER,- Sur la fièvre aphteuse. Congrès international de Médecine Vétérinaire de Baden-Baden.1899,356-365.

HENDERSON,W.M.- The quantitative study of foot-and mouth disease virus. Agric.Res.Council Rep.Series,1949,n°8.

HENDERSON,W.M.,& BROOKSBY,J.B.- The survival of Foot-and Mouth Disease virus in meat and affal.J.Hyg.,1948,26,394-402.

HERRMANN,G.,& KITT,Th.- Versuche über Maul-und Klauenseuche. Jahresber der tierärztl.Hochsch.Münch,f.1896-97-98,52-57.

HOBMAIER,- Die empfänglichkeit Kleiner Versuchstiere für Maul-und Klauenseuche.Deutsch.Med.Wochenschr.,1921,47,616.

HOFFMAN,D.- The effect of testicular extract on filterable virus. J.Exp.Med.,1931,53,43-50.

HOFFMANN,W.- Mittelunh über weitere Versuche mit dem bei der Maus neutropen Stamm B des Maul-und Klauenseuchevirus.Zentralbl.Bakt., 1944,Orig.151,161-167.

HOFFMANN,W.- Weitere Untersuchungen über den neurotropismus des Maul-und Klauenseuchevirus.Zentralbl.Bakt.,1941,Orig.147,69-77.

HORSFALL,F.L.- Viral multiplication.Federat.Proceed.,1949,8,518.

[illegible] - [illegible] über Morphologie u.d Züchtung von [illegible] Virusarten. Zentralbl. Bakt., 1917, Orig., 76, [illegible]

[illegible] - [illegible] und Klauenseuche. Spez. Pathol. Therap. [illegible], 3ème Edition en 1920. Deuxième Edition anglaise 1920 Mohler et Eichorn Edit.

JANSSEN [illegible] Klauwzeervirus I. Het neerslaan van virus met alcohol en aether. Verslag over de Werkzaamheden van het Staats veeartsenijkundig Onderzoekingsinstituut. S. Gravenhage., 1933-34, 108.

JANSSEN, L.W.- Over droog Mond-en Klauwzeerserum. Verslag over de Werkzaamheden van het Staats veeartsenijkundig Onderzoekinsinstituut S. Gravenhage., 1933-34, [illegible].

JANSSEN, L.W.- Intra cerebrale injecties van Mond-en Klauwzeervirus by cavia. Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 1934, 61, 567.

JANSSEN, L.W.- The virus of the Foot-and Mouth disease a nucleoprotein. Verslag over de Werkzaamheden van het Staats veeartsenijkundig Onderzoekinsinstituut. S. Gravenhage, 1938, 62.

JANSSEN, L.W.- Het Mond-en Klauwzeerzeewaagstuk bekeken van chemische zijde. Verslag over de Werkzaamheden van het Staats veeartsenijkundig Onderzoekinstituut. S. Gravenhage, 1938, 67.

JANSSEN, L.W.- Essai de vaccination avec du virus aphteux rendu insoluble. Bull. Off. Intern. des Epiz., 1937, 14, 348-349.

JANSSEN, L.W.- Experimenteel en theoretisch virusonderzoek. Chem. W BL. Nederl., 1948, 44, 392-393.

JOUAN, C., et STRAUB, A.- Etude sur la peste aviaire. Ann. Inst-Pasteur., 1920, 34, 343-347.

JOUVENEL.- Rapport fait à la Société d'Agriculture de Seine-et-Oise le 3 Avril 1812. Ann. Agriculture Française [illegible], 360-361.

KRAUS, [illegible] Meerschweinchenhoden und Maul-und Klauenseuche [illegible] Zeitschr. Infektionskr. Haustiere., 1923, 162.

KALBSCHMIDT, [illegible] Resultate meiner Impfversuche bei der Maul-und Klauenseuche in den Jahren 1838 und 1839. Magazin für gesammte Thierheilkde, 1842-1852.

KLOUBOUK,A.- Ueber Einfluss verschiedener Warmagrade auf das Virus der Maul-und Klauenseuche.Das Verhalten des virus im Froschkorper Zverol.Obz.,1925,17,(Czech).

KOBE,K.-Ergebnisse und Problem zur Klärung des Immunisierungs Vorganges nach der Aktiven Schützimpflung gegen Maul-und Klauenseuche.Deutsch.Tierärztl.Wochenschr.,1941,49,13-16,et 35-37.

KOBE,K.,& FERTIG,H.- Die Züchtung des Maul-und Klauenseuchevirus in Reinkulturen von Epithelzellen und Fibroblaten.Zentralbl. Bakt.,1936,Orig.,1938,14-20.

KOBE,K.,& WAHL,F.- Weitere Untersuchungen über eine infektiositats-steigeinde Komponente des Maul-und Klauenseuchevirus. Zentralbl. Bakt.,1938,Orig.,142,353-359.

KOEFOED,H.- Om Dyrkning af Mund-og Klovesygevirus paa lunggevaev af kalvefoestre.Maanedsskr.Dyrlaeger.,1943,54,45-51.

LANDSTEINER,K.,& BERLINER,L.- Ueber die kulturerung des virus der Hühnerpest.Zentralbl.Bakt.1912-1913,Orig.,67,165-163.

LANGEBBECK,W.,& ENDERLING,A.- Einfluss der Vitamine auf das virus des Maul-und Klauenseuche.Zentralbl.Bakt.,1937,140,112-115.

LEBAILLY,Ch.- Sur la durée de la période contagieuse dans la fièvre aphteuse.C.R.Acad.Sci.,1922,174,180-182.

LEBAILLY,Ch.- Expériences concernant le virus aphteux.C.R.Acad. Sci.,1926,183,578-589.

LECLAINCHE,E.- La fièvre aphteuse. 10ème Congrès international de Médecine Vétérinaire Londres 1914.

LECLAINCHE,E.- La fièvre aphteuse.Rev.Génér.Méd.vétér.,1914-1915, 24,201-210.

LECLAINCHE,E.,& VALLEE,H.- La sérothérapie et la séroprophylaxie, la vaccination de la fièvre aphteuse : leur valeur au point de vue de la police sanitaire. 9ème Congrès de Médecine vétérinaire de la Haye,1909,3,Première section. Rapport III.

LEMETAYER,E.,NICOL,L.,JACOB,L.,GIRARD,O.,& CORVAZIER,R.- Immunité antitoxique transmise de la jument au poulain,cas particulier de l'immunité des juments vaccinées contre le tétanos. Ann.Instit Pasteur.,1947,73,297-323.

LEPINE,P.- Culture des virus dans l'oeuf de poule incubé. In Levaditi,C., et Lépine,P. ; Les ultra-virus des maladies humaines. 2ème édition. Maloine Edit.Paris 1948,1567-1632.

LEPINE,P.,& SAUTTER,V.- Etude histologique des lésions dues aux ultra-virus : les acides nucléiques. Ann.Inst. Pasteur.,I946,72,I74-I83

LEPINE,P.,& STRUNGE,T.- Sur la place des virus et sa représentation dans l'ensemble des êtres organisés. Ann. Inst.Pasteur.,I950,79,322-325.

LEVADITI,C.- Virus rabique et culture des cellules " in vitro ".C.R.Soc.Biol.,I9I3,75,505-507.

LEVADITI,C.- Images électroniques en biologie. Maloine Edit.,Paris,I94[illegible].

LEVADITI,C.- Une source neurotrope du virus de la fièvre aphteuse. C.R.Soc.Biol.,I942,I36,477-478.

LEVADITI,C.- L'adsorption des virus sur les hématies,étudiés au moyen du microscope électronique. Presse médicale,I950,58,449-450.

LEVADITI,C.,GALLOWAY,I.A.,& NICOLAU,S.- Essais de culture du virus aphteux dans le cerveau de lapin. C.R.Soc.Biol., I927,96,395-397.

LEVADITI,C.,AUGUSTIN,[illegible],& VAISMAN,A.- Effets dispersifs de l'hyaluronidase sur certains ultra-virus. C.R.Acad.Sci., I949,228,442-444.

LEVADITI,C.,& LEPINE,P.- Les ultra-virus des maladies humaines. Ière édition. Maloine Edit.,Paris I938,2ème édition,I948.

LEVADITI,C.,LEPINE,P.,& VERGE,J.- Les ultra-virus des maladies animales. Maloine Edit.,Paris,I943.

LEVADITI,C.,NICOLAU,S.,& GALLOWAY,I.A.- Passage du virus de la fièvre aphteuse à travers les membranes en collodion. C.R.Acad.Sci.,I925,I82,247-248.

LEVADITI,C.,NICOLAU,S.,& GALLOWAY,I.A.- Les affinités tissulaires du virus aphteux. C.R.Soc.Biol.,I926,95,I230-I232.

LEVADITI,C.,PERAULT,R.,& SERGENT,C.- Effets des inoculations de la souche du virus aphteux dans la membrane chorio-allantoïde de l'oeuf incubé de poule. C.R.Soc.Biol., I944,I38-I39.

LEVADITI,C.,& VAISMAN,A.- Effets virulicides de l'auréomycine. C.R.Soc.Biol.,I950,I44,326-328.

[illegible],& RIVERS,T.[illegible]- Cultivation of vaccine virus. J.Exp. Med.,[illegible]

LIGNIERES,J.- La lutte contre la fièvre aphteuse. Rev.Path.Comp., 1921,21,29-35 : 64-73, 75-83 et III-II5.

LINDBERGH,C.A.- An apparatus for the culture of wohle organs.J.of Exp.Med.,1935,62,409-431.

LLOYD,W.,THEILLER,M.,& RICCI,N.I.- Modification of the virulence of yellow fever virus by cultivation in tissues " in vitro ". Tr.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.,1936,29,481.

LOEFFLER,F.- Recherches sur la fièvre aphteuse. Rec.Med.vétér., 1898,5,330 : 632 et 716-720.

LOEFFLER,F.- Ueber die Veränderung der Pathogenität und Virulenz pathogener Organismen durch Künstliche Fortzuchtung in bestimmten Tierspezies und über die Verwendung solchen organismen zu Schutzimpfungszwecken. Deutsch.Med.Wochenschr.,1906,1240-1243.

LOEFFLER,F.,& FROSCH,P.- I.Summarischer Bericht über die Ergebnisse der Untersuchungen zur Erforschung der Maul-und Klauenseuche bei dem Erforschung Institut für Infektionskrankheiten. II. Bericht der Kommission zur der Maul-und Klauenseuche bei dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin.Zentralbl.Bakt.,1897, 22,257-259.

LOEFFLER,F.,& FROSCH,P.- Berichte der Kommission zur Erforschung der Maul-und Klauenseuche bei dem Institut fur Infektionskheiten in Berlin.Zentralbl.Bakt.,1898,23,371-391.

LONG,J.A.- A pulsating circulation apparatus for tissues cultures, embryos an small organs. Univ.California Publ.Zool.,193?,43, 2II-226.

LUCAS,A.- L'augmentation du pouvoir pathogène du virus aphteux. Bull.Acad.Vétér.France,1948,21,123-131.

MAAS,- Weitere Fesystellungen über die Dauer der Immunität nach der aktiven immunisierung mit Riemser M.K.S. vaccine nach . Waldmann und Köbe. Berlin.München.tierärztl.Wochenschr.,1940, 56,49-52.

MAITLANDS,[illegible].- Experiments on the localisation of the lesions and on local immunity in Foot-and Mouth disease.Third Progress Report of the Foot-and Mouth Disease Research Committee,Stationery Office London,1928,96-103.

MAITLAND,H.B.,[illegible] - Further information on Foot-and Mouth disease. J.Comp.Path.a.Therap.,1927,40,[illegible].

MAITLAND,H.B.,& MAITLAND,[illegible].- Cultivation of vaccinia virus without tissue culture. Lancet,1928,215,596.

MAITLAND,H.B.,& MAITLAND,M.C.- Cultivation of Foot-and Mouth disease virus. J.Comp.Path.a.Therap.,1931,44,106-113.

[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]

MARCHOUX,E.- Culture in vitro du virus de la peste avi[illegible]
re.C.R.Acad.Sci.,1908,147,377.

[illegible]RXER,A.- Nuevos conocimientes sobre [illegible]
Revista del Circulo Medico veterinario de [illegible]
cia de Buenos-Aires, La Plata,1940.

[illegible]
[illegible]
[illegible]

[illegible]N,J.A.- Adaptation de la technique de culture de
[illegible] à l'étude des virus. Thèse Doct.Paris,1940.

MEZINSCESCU,D.,BAROFI,V.,& CALINESCU,I.- Recherches
[illegible] Inst.
Pasteur.,1923,37,1057-1063.

[illegible]
[illegible] pos-[illegible]
Maanedsskr.Dyrlaeger.,1947,57,105-106.

[illegible]
over Lindholms Erfaringer med Virusudvikling og
kulturvacciner igennem 10 aar.Maanedsskr.Dyrlaeger.,
1946-1947,58,85-105.

[illegible]
[illegible]

MICHELSEN,C.- Essais d'adaptation du virus aphteux à
l'[illegible]
[illegible]mmission de l'O.I.E. (fièvre aphteuse) 1951.
[illegible]

MINETT,F.C.- Research on Foot-and Mouth disease.Veteri-
nary Record,1927,7,295-300.

[illegible]- [illegible] Uebertragung der Maul-und Klauenseu-
[illegible] für 1935,73.

MOHLMANN,H.- Immunitätsdauer und Grenzen von Immunitäts-
[illegible]
[illegible] München.tierärztl.Wochenschr.
[illegible]

MOOSBRUGGER, G. A.- L'incidence des produits [illegible] présents dans les suspensions de virus aphteux sur [illegible] du virus. Bull. Off. Intern. des Epiz. [illegible]

MORNET, P.- Rapport de mission aux [illegible] de la Recherche Scientifique Coloniale Paris 1947.

MOUSSU, G.- La fièvre aphteuse. [illegible], 96, 193-[illegible]

MOUSSU, G., & MOUSSU, R.- Traité des maladies du gros bétail. Vigot Edit. Paris, 1925, 927.

NAGEL, H. C.- Untersuchungen über das Verhalten des Maul-und Klauenseuche virus im Zentralnervensystem kleiner Versuchstiere. Deutsch. tierärztl. Wochenschr., 1937, 45, 624-625.

NICOLAU, S., & GALLOWAY, I. A.- Activité pathogène du virus de la fièvre aphteuse pour le lapin. C. R. Soc. Biol., [illegible], 93, [illegible]

NIESSE, H.- Die Ergebnisse der Maul-und Klauenseuche Übertragungsversuche mit der Reinkultur des von [illegible] den Erreger der Seuche gehaltenen Bakteriums vor der Kommission des Kgl. preuss. Landwirtschaftsministeriums [illegible] in Berlin August bis November 1911. Deutsch. tierärztl. Wochenschr., [illegible] et [illegible]

NIESSE, H.- Maul-und Klauenseucheerzeugung beim Meerschweinchen mittels der Reinkultur des [illegible] Deutsch. tierärztl. Wochenschr. 1922, 30, 83-[illegible]

NOCARD, E.- La sérothérapie anti-aphteuse. Revue [illegible] Vétér., 1901, [illegible]

NOCARD, E., & LECLAINCHE, E.- Les maladies microbiennes des animaux. Masson, Edit. Paris 1903, [illegible]

OLITSKY, P. K., & BOEZ, L.- Studies on the physical and chemical properties of the virus of Foot-and Mouth Disease. J. Exp. Med., 1927, 45, 833-848.

OLITSKY, P., TRAUM, J., & SCHOENING, [illegible]- Report of Foot-and Mouth disease Commission of the United states department of Agriculture Technical Bulletin N°76, [illegible]

PALMA-ZULOAGA, E. E.- The cultivation of the Foot-and Mouth disease virus on bovine fetal tissue. Veter. Med. U. S. A. 194[illegible], 44, [illegible]

PALMA-ZULOAGA, E. E.- Revue [illegible] des travaux complémentaires de recherches poursuivies au cours de l'année 1947 sur la culture du virus de la fièvre aphteuse (République Argentine). Bull. Off. Intern. des Epiz., [illegible]

PALMA ZULOAGA,E.E.- Cultur del virus aftoso sobre tejidos fatales de origen bovino. Informe de la direccion de pathologie animal. (Division fiebre aftosa desde I944 à I945 Buenos-Aires,I947,7I.

PANISSET,L.- Traité des maladies infectieuses des animaux domestiques. Vigot Edit.Paris,I938,I32.

PANISSET,L.- La fièvre aphteuse. L'origine et les progrès de l'épizootie actuelle. Ses dommages ; leurs causes et leur évolution. Les Cahiers de Médecine Vétérinaire, I939,9,I25-I35.

PANISSET,L.- Les enseignements de la récente épizootie de fièvre aphteuse. Observations et Recherches. Rec. Med.vetér.,I939,II5,794-825.

PARKER,R.C.- The cultivation of large quantities of large adult tissue in fluid media. Science,I936,83,579-58I.

PARKER,R.C.- Methods of tissue Culture. Paul.B.Holber, Inc.Medical Book Department of Harper and Brothers. New-York,I938.

PARRAT,J.- Etude de quelques facteurs influençant le développement des aphtes lors de l'inoculation artificielle des animaux destinés à la production du vaccin antiaphteux. Thèse Doct.Vétér.Berne I948, Orell Füssli Edit.Zurich et Schweiz.Arch.Tierheilkde I948,90,9-29 et 80-96.

PAN,L.(vea)- Compendio de Embriologia y Teratologia, I924,93.

PERAGALLO,I.- Untersuchungen über das Aphthenvirus.I. Gedeihen des Aphthenseuchevirus auf der Chorio-allantois von Hühnerembryonen und seine serienweise Uebertragung.Zentralbl.Bakt.I937,Orig.I40,II6-II7.

PERAGALLO,I.- La culture du virus aphteux sur la membrane chorio-allantoide des embryons de poulet et son passage en série. Ann.Inst.Pasteur.,I937,59,659.

PERARD,C.H.- Rapport sur les opérations des Services Sanitaires Vétérinaires de la Seine pendant l'année I943.Chaix.Impr.Paris,I944.

PETERMANN,H.- Cultivo del virus aftoso en embrion de pollo Gaceta Veterinaria.I949,II,n°60,230-234 et Revista de Medecina Veterinaria,I949,4,373.

PFEILER,W.- Entwicklung von Maul-und Klauenseuche-virus im Regen Zellen bzw. Gewebskulturen.Mitt.d.Tierseuchenstelle der Thüringischen Landesanstalt für Viehversicherung.,1922,3,17-2[illegible].

PFEILER,W.- Einiges über filtrierbare Virusarten und das " Kulturvirus " der Maul-und Klauenseuche.Centralbl.Bakt.Orig.1924,92,574-575.

PFEILER,W.- Zur Züchtung des Erregers der Maul-und Klauenseuche. Centralbl.med.Wochenschr.,1924,50,1331-1332.

PFEILER,W.- Bemerkungen zu verschiedenen Seuchenfragen,insbesondere zu Züchtung des Erregers der Maul-und Klauenseuche. Der Praktische Landwirt, 6 juin,n°23,1924.

PFEILER,W.- Die Züchtung des Maul-und Klauenseucheerregers in krankmachenden Form.Tierärztl.Rundschau.,1924,30,431-433.

PFEILER,W.- Der neueste Stand der Frage der Züchtung des Maul-und Klauenseucheerregers. Ill. Landw.Ztg.,1924,44,330-331.

PFEILER,W.- Grundsätzliche zur Erforschung und Züchtung des Virus Maul-und Klauenseuche.Tierärztl.Rundschau.,1925,632.

PFEILER,W.,& [illegible].- Die Züchtung des Kulturvirus der Maul-und Klauenseuche.Seine Identifizierung mit Hilfe von Immunitätsreaktion.Tierärztl.Rundschau.,1922,507.

PFEILER,L.,& GRUGEL,.- Kurze Mitteilung über die im Landesgesundheitsamt zu Rostock ausgeführten Untersuchungen über die Maul- und Klauenseuche.Berl.tierärztl.Wochenschr.,1913,29,[illegible].

PLATEAU,J.- Sérum antiréticulo-endothélial cytotoxique. Essais cliniques chez les bovidés. Bull.Acad.Vét.France 1930,3[illegible], 219-222.

PLOTZ,H.- Culture de la peste aviaire en présence de cellules embryonnaires vivantes. C.R.Soc.Biol.,1932,110,763-764.

PLOTZ,H.- Identité du " virus de culture " et du " virus de sang " de la peste aviaire. C.R.Soc.Biol.,1934,115,357.

PLOTZ,H.,& [illegible].- La culture de la peste aviaire en présence de cellules vivantes non prolifér[illegible]. C.R.Soc.Biol.,1933, 11[illegible],711-712.

POPPE,K.- Die Züchtung der Erregers der Maul-und Klauenseuche durch Frosch und Dahmen.Deutsch tierärztl.Wochenschr.,1924,32, 189.

POPPE,K.- Die Züchtung des Erregers der Maul-und Klauenseuche durch Frosch und Dahmen.Deutsch tierärztl.Wochenschr.,1924,34,44[illegible]

POPPE K.,& BUSCH,J.- Zur Frage der Symbiose des Virus der Maul und Klauenseuche in pflanzlichen Mikroorganismen. Zentralbl. Bakt.1935,135,185-[illegible].

PORTER,K.,CLAUDE,A.& FULLAM,E.- A study of tissue culture cells by electron microscopy : methods and preliminary observation. J.Exp.Med.,1945,81,233-246.

PYL,G.- Neuer Methoden zur Anreicherung des Maul-und Klauenseuchevirus aus virushaltigen Substraten.Zentralbl. Zentr.Bl. Bakt,1931,Ref.102,234-23[illegible].

PYL,G.- Adsorptionsversuche mit Maul-und Klauenseuchevirus in Pufferlösungen.Zentralbl.Bakt.,1931,Orig,121,10-19.

PYL,G.,& [illegible] - Adsorptionsversuche an Virus der Maul- und Klauenseuche. Zentralbl. Bakt.,1931,Orig.121,[illegible]

QUEVEDO,J.- Informe de la Direccion de patologia animal [illegible] 1947.

RAMON,G.- La vaccination anti-aphteuse et ses progrès. L'oeuvre de l'Office international des Epizooties en ce domaine. Bull.Off.Intern.des Epiz.,[illegible].

RAYNE.- Recherches sur les [illegible] à l'épizootie aphteuse. Rec.Med.Vet.,[illegible].

REINHARDT,R.,& GRUBER.- Zur Züchtung des Erregers der Maul- und Klauenseuche. Berlin.tierärztl.Wochenschr.,[illegible], 38,54.

RICHET,Ch.- Dictionnaire de Physiologie, Felix Alcan Edit. Paris,1904.

RICHTER,H.A.- Ist das Maul-und Klauenseuchevirus auf dem Allanto-Chorion von Hühnerembryonen nach der Methode von [illegible] Züchtung bar ? Zentralbl. Bakt.,[illegible], Orig.,[illegible].

RINJARD,P.- Sur la réceptivité du cobaye vis-à-vis du virus aphteux. [illegible]

RINJARD,P.,[illegible] & [illegible] - Recherches sur la fièvre aphteuse. [illegible] par du virus cultivé " in vivo " chez le cobaye. C.R.Soc.Acad.Sci., 1946,222,1533-1535.

[illegible]

RIVERS, T.M.- Filterable viruses. Williams & Wilkins C°, Baltimore, I92[illegible],4,4[illegible]5 pp.

RIVERS, T.- Virus infections. Bull.N.Y.Acad.Med., I94I,I7,245.

ROGER, G.H., & BINET, L.- Traité de physiologie normale et pathologie. Masson et Cie. Editeurs. Paris, I934.

ROUX, E., VALLEE, H., CARRE, H., & NOCARD, E.- Résumé d'expériences sur la fièvre aphteuse. C.R.Acad.Sci.,I92I,2,II4I-II42.

RUSKA, H., RUSKA-[illegible], C.- Die Entstehung von Tropismusänderungen am Beispiel der Umbildung des dermotropen zum neurotropen Maul- und Klauenseuchevirus. Arch.f.ges.Virus-forschung, I947, [illegible], 34[illegible]-346.

SANDERS, [illegible], & [illegible], [illegible].- Cultivation of virus of equine encephalomyelitis in serum ultrafiltrate salt solution. Proceed.Soc.Exper.Biol.med.U.S.A., I940,45,[illegible]-3[illegible].

SANDERS, [illegible], & [illegible], C.- Tissue culture for virus investigations in the field. Amer.J.Publ.Health.,I944,34,46I.

SANDERS, [illegible], & [illegible].- Critical review of viruses cultivations. Arch.Path.,I93[illegible],2[illegible],54[illegible]-58[illegible].

SCHAFER, [illegible].- Untersuchungen über den Virusgehalt des Blutes und der Organe bei der Maul-und Klauenseucheinfektion von Meerschweinchen. [illegible], I945,I,[illegible]-I0.

SCHMIDT, S.- Immunisierung des Meerschweinchens gegen drei verschiedene Typen von Maul und Klauenseuchevirus vermittels eines trivalenten Aluminiumhydroxydadsorbats. Z.Immunitätsforsch., I936,[illegible],[illegible]-I0[illegible].

SCHMIDT, S.- Immunisierung von Meerschweinchen gegen Maul-und Klauenseuche vermittels des virulenten Kulturvirus und Aluminiumhydroxyde. Zeit.f.Infektionskr.Haustiere., I93[illegible],II8,I33-I3[illegible]

SCHMIDT, S.- Virus - Vaccine. Bull.Off.Intern.des Epiz., I947,27, 267-279.

SCHMIDT, S., & [illegible].- Immunisation active du cobaye contre la fièvre aphteuse au moyen du virus " non atténué " combiné avec l'hydroxyde d'aluminium. Rev.Immunol., I936,2,35[illegible].

SCHMIDT, S., & [illegible].- Vaccination af kvæg mod mund-og klovesyge med vacciner af forskellige antigene typer og i forskellige doser. Maanedsskr.Dyrlæger, I940,5[illegible],30[illegible].

SCHMIDT, S., & [illegible], [illegible].- Irradiation du virus de la fièvre aphteuse par les rayons ultra-violets. J.Vétér.Res., I940,54I.

SCHMIDT-[illegible].- Mund-og klovesyge forsøgsstation paa Lindholm. Aarsskrift der Kgl.Veterinær-og Landbohøjskoles, I92[illegible].

SCHOENING, H.W.- Recent research on Foot-and Mouth disease with special reference to the work of the American Commission. [illegible]

SHOPE, R.E., GRIFFITHS, J.H. & JENKINS, D.L.- Rinderpest I. The cultivation of rinderpest virus in the developing hen's egg. Am.J.veter.Res.,1946,7,135-141.

SILBER, L.A. & WOSTRUCHOWA, [illegible] - Ueber Züchtung der Filtrierbaren Virusarten auf nichtpathogenen Mikroben. Zentralbl.Bakt.,1933,129,389-395.

SIMMS, H. & SANDERS, [illegible] - Use of serum ultrafiltration in tissue culture for studying deposition of fat and propagation of virus Arch.Path.,1942,33,619-635.

SIMMS, H., STILLMAN, N.P.- Substances affecting adult tissue in vitro stimulating action of trypsin of fresh adult tissue. J.Gen.Physiol.,1937,20,604-619.

SIMMS, H. & STILLMAN, N.P.- Substances affecting adult tissue in vitro stimulant " [illegible] factor " in serum ultrafiltrate involved in overcoming adult tissue dormancy. J.Gen.Physiol.,1937,20,649-662.

SMITH, [illegible] - The virulence enhancing factor of mucins. I. A biological assay of virulence enhancing activity. Biochem.J.,[illegible]

SPINOLA, W.- [illegible] speziellen Pathol.und Therap.1858,2,876-921 et 1863,2,60-93.

STANLEY, W.M.- Virus Proteins, a new group of macromolecules. [illegible]

STANLEY, W.M.- Viruses. In "Currents in biochemical research " New-York Interscience Publishers,1946,[illegible]

STOCKMAN, S. & MINETT, F.C.- Researches on the virus of Foot-and Mouth Disease. J.Comp.Path.Therap.,1926,39,1-30.

STOCKMAN, S. & MINETT, F.C.- Experiments on Foot-and Mouth Disease. J.Comp.Path.Therap.,[illegible]

STOCKMAN, S., MINETT, F.C., [illegible] & WATT, W.- Favourable conditions for the survival of virus of Foot-and Mouth disease. Second Progress report of the Foot-and Mouth Disease Research Committee. Stationery Office, London, [illegible]

[illegible] - Die Züchtung des Maul-und Klauenseuchevirus in [illegible] in Gegenwart lebender Zellen. Zentralbl.Bakt.,[illegible] Orig.,100,312-316.

STRICKLER,L. - Die Vermehrung des Maul-und Klauenseuchevirus in Flüssigen Kulturen in Gegenwart lebender Wellen. Zentralbl. Bakt., I933, Orig., I29, 3I2-3I6.

STRICKLER,L. - Ueber Virus Züchtung. Berlin. tierärztl. Wochenschr., I934, 50, 273-275.

STRICKLER,L., & RADU,I.C. - Virulenz Infektiosität und Immunisierende Eigenschaften des Virus der Maul-und Klauenseuche bei der Vermehrung in Gewebekulturen. Zentralbl. Bakt., I935, Orig., I34, 7I-76

STUCKI,J. - Contribution à l'étude de la virulence du virus aphteux. Thèse Doctorat vétérinaire Berne I948 Bruxelles., Imp. Liébens, I948.

SUURBALLE,A.,- Vaccination mod Mund-og Klovesyge. Maanedsskr. Dyrlaeger, I939, 5I, 483-492.

TERNI,C. - Ricerche ed esperienze per lo studio della immunità all'afta. Clinica Vet., I9I6, 39, 257-26I.

THIERY,J.-P., & DRIEUX,H. - Réaction périfocale provoquée chez un bovin tuberculeux par l'inoculation du virus aphteux. Rec. Méd. vétér., I950, I26, 606-608.

THOMAS,J.-André. - Etuve métallique réglable, adaptée à l'appareil d'optique d'Edinger, permettant le repérage et l'observation prolongée à température constante des cultures de tissus. Arch. Exper. Zelleforschg., I936, I8, 250-25I.

THOMAS,J.-André. - Un nouveau flacon pour la culture des tissus sur une lamelle amovible. Arch. Exper. Zelleforschg., I937, 20, 68-7I

THOMAS,J.-André. - Un appareil à nacelle amovible pour la culture des tissus en [illegible] mise ou pour la transplantation in vitro. Arch. Exper. Zelleforschg., I937, 20, 272-273.

THOMAS,J.-André. - Recherches sur les transformations, la multiplication et la spécificité des cellules hors de l'organisme. Ann. Sci. Nat. Zool. I938, IIème série, 20, 575.

THOMAS,J.-André. - Des Epithéliums en cultures et dans l'organisme. Arch. Exper. Zelleforschg., I938, 22.

THOMAS,J.-André. - Un appareil à perfusion stérile et automatique de gros organes ou de parties d'organismes. Ann. Physiol. Physicochem. Biol., I939, I5, 432-44I.

THOMAS,J.-André.- Un autodistributeur de vide et de gaz comprimés pour usage physiologique ou d'autres applications. C.R. Acad. Sci., I939, 209, I0I0-I0I3, erratum, I940, 2I0, 84.

[illegible] des appareils ser-
vant [illegible] des organes. Pré-
[illegible] C.R.Soc Biol.,1941,135,
[illegible]

THOMAS,J.-André.- La survie d'o[illegible] stériles en
milieu antiseptique et nutritif comme procédé d'ana-
lyse morphogénétique. C.R.Acad.Sci.,194[illegible],I48-I50.

THOMAS,J.-André [illegible] nouveaux procé-
dés expérim[illegible] international de Cyto-
logie expérimentale Stockholm,I[illegible] Albert Bon-
vol. Stockholm,Editeur.

[illegible] pour le
[illegible] prolongée des orga-
[illegible] nismes en survie pesant plusieurs kilo-
[illegible] Sci.,1947,225,I090-I09[illegible].

[illegible] dés de perfusion physiolo-
gique et aseptique permettant la survie prolongée des
organes ou des organismes pesant plusieurs kilogrammes.
[illegible]

THOMAS,J.-André.- Les méthodes de perfusion aseptique pro-
longée [illegible] prélevés en
milieu aseptique. Bull.Hist.appl.,1949,Nov.,I8I-I88

THOMAS,J.-André.- La culture massive des tissus [illegible]
[illegible] 5ème con-
grès international du cancer Paris 1950 (à paraître).

[illegible] actuelles du coeur-pou-
[illegible] perfusion totale du corps
[illegible] grès international de chirurgie Paris
[illegible]

THOMAS,J.-André.- Survie du coeur et poumon artificiel.
Atomes,1952,7I,39-45.

THOMAS,J.-André.,& BEAUDOIN,F.- Groupe cardio-pulmonaire
artificiel [illegible] au sang du
corps humain. C.R.Acad.Sci.,1950,23I,3[illegible]0-392.

[illegible] ristiques physiolo-
[illegible] pour la perfusion au
[illegible] Journal de Physiol.,I95I,43,3II-
[illegible]

THOMAS,J.-Andr[illegible] - La survie expérimentale
d'organites [illegible] antisep-
tique et nutritif.C.R.Ac[illegible] ci.,1947,225,963-964.

THOMAS, J.-André, & VARANGOT, J. - La survie du placenta humain perfusé aseptiquement. C.R. Acad. Sci., 1949, 228, 132-133.

THOMAS, J.-André, SALOMON, Louis., & SALOMON, Léone. - Recherches préliminaires sur la culture en masse du virus de la fièvre aphteuse, inoculé au foetus de la vache entretenu en survie par perfusion aseptique. C.R. Acad. Sci., 1948, 227, 310-311.

THOMAS, J.-André, SALOMON, Louis., & SALOMON, Léone. - La survie des grands foetus des mammifères perfusés aseptiquement. J. Physiologie., 1948, 40, [illegible]

THOMAS, J.-André, SALOMON, Louis., SALOMON, Léone., & LACY, François. - La survie expérimentale aseptique des grands foetus de mammifères. C.R. Acad. Sci., 1948, 226, 966-968.

THOMAS, J.-André, THIERY, J.-Pierre., SALOMON, Louis., & SALOMON, Léone. Essai de culture du virus aphteux sur foetus de bovin en survie aseptique. Bull. Off. internat. des Epiz., 1951, 25, 54.

THOMAS, J.-André, THIERY, J.-Pierre, SALOMON, Louis, SALOMON, Léone, & THIERY, J.-Paul. - La culture massive du virus de la fièvre aphteuse sur peau de foetus en liquide amniotique d'[illegible] et [illegible]rifié. C.R. Acad. Sci., 19[illegible], 23[illegible], [illegible]

TITZE, C. - Demonstration von Reinkulturen des Erregers der Maul-und Klauenseuche. Sitzungsbericht der Berliner Gesellschaft für Mikrobiologie. Zentr. Bl. Bakt., 1922, 7[illegible], 242-24[illegible]?

TITZE, C. - Kulturen des Maul-und Klauenseuchevirus in künstlichen Nährböden. Schweiz. Arch. Tierheilkde., 1922, 64, 191.

TITZE, C. - Die Züchtung des Erregers der Maul-und Klauenseuche. Berlin tierärztl. Wochenschr., 1922, 38, 36-38.

TITZE, C. - Experimentelle über die Maul-und Klauenseuche mit besonderer Berücksichtigung der Züchtung des virus. Zentralbl. Bakt., 1924, orig., 93, 124-125

TITZE, C. - Zur Züchtung des virus der Maul-und Klauenseuche. Zeitschr. Infektionskr. Haustiere., 1924, 26, 107-1[illegible]5?

TORTORELLA, & FREIRE - MUNOZ. - Rapport sur la vaccination contre la Fièvre aphteuse. Boletin Informativo del Uruguay 1943, 39[illegible]

TOUREWITCH, [illegible] - Nature des ultra virus de l'homme et des animaux. Advance mod. Biol. [illegible], 1948, 21, 207-214.

TOUSSIENG, E. - Dyrkningsforsøg med mund-og klovesygevirus paa hjernevæv af marsvinefostre. Maanedsskr. Dyrlæger, 1935, 47, 305-315.

TOUSSIENG, E. - Immunisation active des bovidés contre la fièvre aphteuse au moyen [illegible] d'[illegible]. Bull. Off. Internat. des Epiz., 1936, [illegible], [illegible]

TOUSSIENG,[illegible] - [illegible] Immunisering af Kalve ved Injektion af [illegible] i Rygmarvskanalen. Maanedsskr [illegible] 144-151.

TOUSSIENG,[illegible] - [illegible] l'Institut de Recherches [illegible] Maanedsskr for Dyrlaeger. [illegible]

TOUSSIENG,[illegible] - Om Mund-og klovesygevirus-typer [illegible] Virus [illegible]on. Maanedsskr for Dyrlaeger. [illegible]

TOUSSIENG,G.E.,FOGEDBY,E.,FRENKEL,H.S.,& WAVEREN,(van).- Aktiv Immunisering af [illegible] of kvaeg mod Mund-og klovesyge udført med [illegible]virus dels adsorberet dels frit. Maanedsskr [illegible] 1938,50,353-365.

TOUSSIENG,[illegible],FOGEDBY,E.F.,FRENKEL,H.S.,& WAVEREN,G.(van) [illegible] active des porcs et des bovidés contre la [illegible] le virus de culture adsorbé et à l'état [illegible] 1938,16,205-216.

TRAUB,[illegible] - [illegible] du virus aphteux sur embryons de poulet. [illegible] 1944,31,470-481.

TRAUB,F.,[illegible] des Virus der Maul-und Klauenseuche [illegible] Zeitschr.f.Naturforsch. [illegible]

TRAUTWEIN,K. - Vergleichende [illegible]ungen über die des-Infektionswirkung, Sub[illegible], [illegible]aldehyd, Caporit und [illegible]-und Klauenseuche. Arch. Tierheilkde., 1925,52,254-272.

TRAUTWEIN,[illegible] des Maul-und Klauenseuchevirus [illegible] Arch. Tierheilkde., 1926,54,27[illegible]

TRAUTWEIN,K.,THOMASHOF[illegible] - Die Infektiosität von Harn, Kot, [illegible] bei Maul-und Klauenseuchekranken Tieren [illegible]heilkde., 1928,58,138-171.

[illegible] - [illegible]es sur les différents virus [illegible] qui ont sévi dans la plaine du [illegible] années. Bull Off. [illegible] 627-643. La Clin. Vétér. [illegible],11,16.

UHLENHUTH,[illegible] der Maul-und Klauenseuche auf das [illegible] Med. Wochenschr., 1921,47,171.

[illegible] invisibles ". Rev. génér. Méd. [illegible]

VALLEE,H.- La fièvre aphteuse. Conférence prononcée sous le patronage de l'Institut de l'Université de Buenos-Aires,Université de Buenos-Aires,Faculté d'Agronomie.Imprimerie de l'Université, 1929,157.

VALLEE,H.- L'état actuel de nos connaissances sur la fièvre aphteuse Bull.Soc.Vét.Praticiens du Nord,1911,79,69.

VALLEE,H.- Les récentes acquisitions sur la fièvre aphteuse. Bull. Soc.Sci.Vétér.Lyon,1922,25,3-32 et 159-282.

VALLEE,H.- Récentes acquisitions sur la fièvre aphteuse. Rev.Vétér.,1923,722-723.

VALLEE,H.- L'état actuel de nos recherches sur la fièvre aphteuse. Anc.Méd.Vétér.,1924,69,337-348.

VALLEE,H.- Sur la vaccination antiaphteuse,(conférence).Rev.Vétér. et J.Méd.vétér.et Zootech.réunis,1928,80,324-335.

VALLEE,H.- La vaccination antiaphteuse. Bull.Off.Intern.des Epiz., 1929,1930,3,717-736.

VALLEE,H.- De l'état physique des antigènes et de leur activation. Dumontière,Edit.Dijon,1942.

VALLEE,H.- Sur la pluralité et la mutabilité des virus aphteux. C.R.Acad.Agriculture,1946,32,551-552.

VALLEE,H.- Formolisation à doses limites et vaccination contre les ultravirus. C.R.Acad.Sci.,1946,222,775-776.

VALLEE,H.,CARRE,H.- Sur l'adsorption du virus aphteux. C.R.Acad.Sci., 1921,172,185-187.

VALLEE,H.,& CARRE,H.- Sur la sensibilisation du virus aphteux. C.R. Soc.Biol.,1924,90,1009-1010.

VALLEE,H.,CARRE,H.,& RINJARD,P.- Sur l'immunisation antiaphteuse Bull.Soc.Centr.Méd.Vétér.,1925,78,257-259.

VALLEE,H.,CARRE,H.,& RINJARD,P.- Sur l"immunisation antiaphteuse. Rev.vétér.,1926,78,367.

VALLEE,H.,CARRE,H.,& RINJARD,P.- Sur l'immunisation antiaphteuse par le virus formolé. Rev.génér.Méd.vétér.,1926,35,129-134.

VALLEE,H.,CARRE,H.,& RINJARD,P?- Sur la vaccination antiaphteuse. Bull. Off.Intern.des Epiz.,1927,I,589-591.

VALLEE,H.,CARRE,H.,& RINJARD,P.- Sur la vaccination antiaphteuse. Rev.génér.Méd.vétér.,1928,37,257-259.

[illegible] vaccination anti- [illegible] 177-182.

VALLEE,H.,CARRÉ,[illegible] La vaccination contre [illegible] par la méthode de Vallée, Carré et Rin[illegible]

[illegible] La fièvre aphteuse, in LEVADITI et [illegible] : Les Ultravirus [illegible] Maloine Edit. Paris,[illegible]

VERGE,J.,& GORET,P.- Les méthodes de l'immunisation dans les maladies [illegible] 1930,[illegible] [illegible]

VERNE,J.- La vie cellulaire hors de l'organisme. La culture des tissus. G.Doin et Cie.Edit.Paris,1937.

[illegible] Français de la fièvre aphteuse. Thèse [illegible]

[illegible] Culture des tissus appliquée à la culture des [illegible].Biologie médicale,1937,27,614-624.

WAGENER,K.- Infection und Immunität bei der experimentellen [illegible] Arch.Tierheilkde., [illegible]

[illegible] seucheerregers. Berlin.tierärztl.Wochenschr.,1923,39, 105-106

WALDMANN,O.- Experimentelle Untersuchungen über die Richtigkeit der [illegible] des Maul-und Kl[illegible] [illegible]

[illegible] Klauenseuche. IIème Congrès International de [illegible] Vétérinaire de Londres,1930.

WALDMANN,O.- La méthode de culture des virus avec considération spéciale du virus de la fièvre aphteuse. Bull. [illegible]

WALDMANN,O.,& [illegible] Die aktive Immunisierung des Rindes gegen Maul-und Klauenseuche. [illegible] 317-320.

WALDMANN,O.,& PAPE,J.- Experimentelle Untersuchungen über Maul-und Klauenseuche. Berlin.tierärztl.Wochenschr., 1921,37,349-354.

WALDMANN,O.,& [illegible] Die Dauer der Infektiosität der Mundschleimhaut bei der Maul-und Klauenseuche des Rindes. Arch.Tierheilkde.,1927,55,[illegible]

WALDMANN,O. & [illegible] - Experimentelle Untersuchungen der aktiven Immunisierung gegen Maul-und Klauenseuche [illegible] [illegible] ,I937,[illegible]7,20[illegible]-32[illegible].

WALDMANN,O., & [illegible] L. - [illegible] und Immunität bei Maul- und Klauenseuche [illegible] ,I9[illegible]2,[illegible],I[illegible]2-I[illegible].

WA[illegible] - [illegible] van een [illegible] bij [illegible] ,witte [illegible], [illegible] en varken; Verslag over de [illegible] van het Staats [illegible] [illegible] over I9[illegible]-I934 'S Gravenhage,I934,[illegible]-[illegible].

WA[illegible] - [illegible] met mond-en klauwzeer[illegible] bij [illegible] en [illegible] Verslag over de [illegible] van het Staats [illegible]; Onderzoekingsinstituut over I93[illegible]- I93[illegible] 'S Gravenhage,I934,[illegible]-[illegible].

W[illegible] & HUNGESTER W.J.- Effect of mucin on [illegible] virus infection in hamster.Sciences,I942,96,92-93.

W[illegible],L.- Ueber das Verhalten des filtrierbaren Virus ([illegible] Maul-und Klauenseuche) [illegible] von Hühnerembryonen.[illegible] [illegible] ,I938,Orig.I4I,I4-2I.

W[illegible] - Lehrbuch der Seuchen und ansteckenden Krankheiten [illegible] tiere.Zürich,I833

W[illegible] - [illegible] des virus [illegible] vitro [illegible] [illegible] [illegible]

W[illegible] - [illegible] cultures [illegible] sur membranes plastiques sans repiquage et [illegible] cultures colorables [illegible] Ann.Inst.Pasteur,I947, 73,987-I0[illegible]2.

WOODRUFF,A.M.,& [illegible] The susceptibility of the chorio-allantoic Membrane of chick embryos to infection with fowl pox virus.Amer.J.Path.,I93I,7,209.

WOO[illegible] & [illegible] - Micrological and germ-free methods. VI [illegible] as an experimental animal in [illegible] [illegible] ,I943,8,I44-I[illegible].

YAMA[illegible] - Ueber den Einfluss des [illegible] auf die [illegible] der [illegible] an der [illegible] [illegible] ,I950,I92,I07-III.

[illegible] - [illegible] d'interférence entre [illegible] virus et autre virus et germes [illegible] ,I9[illegible],I[illegible]-I[illegible]

[illegible] - [illegible] de la fièvre aphteu[illegible]
[illegible]

[illegible] - [illegible] des Maul-und Klauenseuchevirus mit dem Univer[illegible]
Die Naturwiss.1940,28,531-532.

[illegible] - Étude du virus de la fièvre aphteuse au microscope électronique. Premier Congrès international de la microscopie électronique. Paris 1950.

BESSIS,M.- Le membrane des g[illegible] rouges et [illegible]
[illegible]

CAMARGO,N.F. - La lutte contre la fièvre [illegible] au moyen de la vacci[illegible] Off.Intern.des Epiz.[illegible]

[illegible] K.- Beitrag zur Züchtung des Virus der Maul-und Kl[illegible]
[illegible] Exper.[illegible]
1950,I,14-23.

[illegible] du virus de l'oeuf
de [illegible]

FRENKEL,H.S.- La culture du virus de la fièvre aphteuse sur [illegible]
Tijdschrift voor Diergeneeskunde,1936,63,68.

FRENKEL,H.S. - Research on Foot-and Mouth Disease.- II) the cultivation [illegible] of tongue epi-
thelium of bovine animals.Amer.J.of.veter.Research.,1950,
[illegible]

FRENKEL,H.S. - Research on Foot-and Mouth Disease.- III) The cultivation of the virus on a practical scale in Explantations of bovine [illegible] Amer.J.Of Veter.Research.,1951.

GIRARD,H.,BE[illegible] J.,& MACKOWIAK,C.- Le virus de la fièvre aphteuse [illegible] au microscope électronique.Bull.Soc.Sciences vétérinaires de Lyon.1950.

[illegible] - [illegible]
J.of Infectious Diseases 1951,[illegible]

[illegible] - Au sujet de l'Epizootie actuelle de fièvre aphteuse [illegible] et Immunologiques.
[illegible] Off.Intern.des Epiz.,1952,37,102-21.

[illegible] - [illegible] des Maul-und Klauenseuchevirus.
[illegible],15,412-416

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
I) PLAN	7
II) ETUDE DU VIRUS APHTEUX	11
1) Généralités	11
2) Propriétés du virus aphteux	18
A) Propriétés physiques	21
B) Propriétés chimiques	54
C) Propriétés biologiques	85
a) pouvoir pathogène	85
la fièvre aphteuse	85
caractères du virus	92
identification du virus	105
conservation du virus	107
b) pouvoir immunisant	101
3) Lutte contre le virus aphteux	103
III) CULTURE DU VIRUS APHTEUX	119
1) Divers procédés anciens de culture du virus aphteux	119
A) Culture <u>in vivo</u>	119
a) espèce bovine	121
lymphe et paroi des aphtes	121
salive	142
sang	145
b) espèce porcine	152
lymphe	152
aphtes artificiels	154
c) espèce ovine	155
pustules de Borrel	155
culture en symbiose avec le virus claveleux	156
oedèmes artificiels	157
d) espèces de laboratoire	158
cobayes	158
lapins	165
souris	167
e) facteurs favorisant les cultures <u>in vivo</u>	171
B) Culture <u>in ovo</u>	176
C) Culture <u>in vitro</u>	188
a) culture en symbiose avec des levures et des bactéries	188
b) culture en milieux dépourvus de cellules vivantes	190
essais divers	191
facteurs influençant la survie du virus	195
c) culture sur les cultures de tissus	207
procédés expérimentaux	207
techniques générales	210

résultats 231
applications pratiques 239
culture du virus aphteux 240
méthodes de CARREL et dérivées 240
méthodes de MAITLAND et dérivées 250
synthèse 273

2) Nouveaux procédés de culture en masse du virus aphteux 305
Introduction 305
A) Culture *in situ* sur épithélium de langue ou de rumen des bovidés (méthode FRENKEL) 313
B) Culture sur foetus bovin mis en survie expérimentale par perfusion (méthode J.-André THOMAS, J.-Pierre THIERY, Louis et Léone SALOMON) 323
a) matériel utilisé 323
b) procédé expérimental de la survie aseptique des organes 327
c) perfusion aseptique des foetus de Bovin 333
d) culture du virus aphteux 348
C) Cultures *in vitro* en milieux ultrafiltrés ou déprotéinés 379
Introduction : culture en sérum ultrafiltré 379
a) culture en liquide amniotique déprotéiné (méthode J.-André THOMAS, J.-Pierre THIERY Louis et Léone SALOMON & J.-Paul THIERY) 384
b) culture en liquide céphalo-rachidien 387
matériel 387
préparation des constituants 388
suspension virulente 388
tissus 390
liquide céphalo-rachidien 391
conditions générales et d'incubation 395
évolution des cultures 396
résultats 396
variations des conditions de culture 418
stockage des flacons de culture 420
conclusions 422

IV) DISCUSSION GENERALE 425

V) CONCLUSIONS GENERALES 429

VI) BIBLIOGRAPHIE

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

MODE D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES SUR LES ULTRAVIRUS :

DONNÉES EXPÉRIMENTALES

Vu et approuvé :

Paris, le 12 Juin 1952

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

A. CHATELET.

Vu
et Permis d'imprimer :

**Le Recteur de l'Académie
de Paris,**

Jean SARRAILH.